

Vergleichende morphologische - anatomische und physiologische
Untersuchung zur Samenanlagenqualität von *Cyclamen persicum* Mill.-
unter besonderer Berücksichtigung der Saatgutqualität

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M.Sc. Sandra Reinhardt

geboren am 30. Juli 1975 in Erfurt

Gutachter:

- Prof. Dr. Frank H. Hellwig,
Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Prof. Dr. Eckhard George
Humboldt-Universität zu Berlin
- Prof. Dr. Michael Kruse
Universität Hohenheim
- Dr. habil. S. Jost Casper
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der mündlichen Doktorprüfung:
Tag der öffentlichen Verteidigung:

6. Juli 2005
23. Januar 2006

Für Laura

1	Einleitung und Zielstellung1
2	Material und Methoden6
2.1.	Material6
2.1.1.	RAPD-PCR Untersuchungen7
2.1.2.	Kultivierungsbedingungen8
2.2.	Methoden8
2.2.1.	Bestäubungsexperimente8
2.2.2.	Untersuchungen zur Pollenvitalität9
2.2.3.	Untersuchungen zu anatomisch-morphologischen sowie physiologischen Merkmalen unbefruchteter sowie befruchteter Samenanlagen9
2.2.3.1.	Präparation der Objekte9
2.2.3.2.	Mikroskopische Färbemethoden11
2.2.3.3.	Mikroskopische Untersuchungen12
2.2.4.	Computerunterstützte Bildanalyse12
2.2.5.	Position der Samen in der Kapsel12
2.2.6.	Analyse der löslichen Proteine13
2.2.7.	Kohlenhydratanalyse14
2.2.8.	Keimfähigkeits- und Triebkraftprüfung15
2.2.8.1.	Prüfung in Kunststoffpetrischalen15
2.2.8.2.	Prüfung in Glaspetrischalen15
2.2.8.3.	Prüfung in Substrat15
2.2.9.	Flowcytometrische Analysen16
2.2.10.	Statistische Auswertungen17
3	Ergebnisse19
3.1.	Samenanlagenmerkmale19
3.1.1.	Anatomisch-morphologische Untersuchungen zu Aufbau und Struktur der Samenanlagen19
3.1.1.1.	Grundlegende Untersuchungen19

3.1.1.2.	Spezielle anatomisch-morphologische Untersuchungen zur Beschaffenheit der Embryosäcke	23
3.1.2.	Physiologische Untersuchungen an den Samenanlagen	26
3.1.2.1.	Physiologische Untersuchungen an unbefruchteten Samenanlagen	26
3.1.2.2.	Physiologische Untersuchungen an befruchteten Samenanlagen	32
3.2.	Samenentwicklung und Samenqualität	34
3.2.1.	Pollenvitalität	34
3.2.2.	Samenentwicklung	35
3.2.2.1.	Untersuchungen zur Megasporenmutterzellentwicklung	35
3.2.2.2.	Pollenschlauchwachstum	35
3.2.2.3.	Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse befruchteter Samenanlagen	36
3.2.3.	Samenqualität	38
3.2.3.1.	Samengewicht	38
3.2.3.2.	Ausgewählte Sameninhaltsstoffe als innere Qualität der Samen	40
3.2.3.3.	Ergebnisse aus den Keimprüfungen	49
3.2.3.4.	Ergebnisse aus den Triebkraftprüfungen der Keimlinge	50
3.3.	Einfluss der Samenanlagenposition an der Plazenta bzw. Samenposition in der Kapsel auf Samenanlagen- und Samenparameter	52
3.3.1.	Einfluss der Samenanlagenposition an der Plazenta auf ausgewählte Samenanlagenmerkmale	52
3.3.1.1.	Embryosackheterogenität zu Anthesebeginn	52
3.3.1.2.	Pollenschlauchwachstum in Abhängigkeit von der Position der Samenanlagen an der Plazenta	53
3.3.1.3.	Größe der Embryosackflächen und Größenzunahme nach induzierter Bestäubung	54
3.3.2.	Samenentwicklung in Abhängigkeit zur Position an der Plazenta	56
3.3.3.	Positionseffekte auf die innere Qualität der Samen	59

3.3.3.1.	Samengewicht59
3.3.3.2.	Ausgewählte Sameninhaltsstoffe60
3.3.4.	Einfluss der Samenposition in der Kapsel auf die Samenqualitätsparameter Keimfähigkeit und Triebkraft66
3.3.4.1.	Keimfähigkeit in Abhängigkeit zur Samenposition66
3.3.4.2.	Triebkraft der Keimlinge in Abhängigkeit zur Samenposition in der Kapsel71
3.4.	Beziehungen zwischen der Samenanlagenqualität und Samenqualität73
3.5.	Korrelationen zwischen den Samenparametern und der Keimfähigkeit sowie der Triebkraft77
4	Diskussion79
4.1.	Samenanlagenmerkmale79
4.1.1.	Allgemeine Anatomie und Morphologie79
4.1.2.	Spezielle anatomische Untersuchungen - Embryosackheterogenität80
4.2.	Physiologische Untersuchungen an den Samenanlagen81
4.2.1.	Calloseeinlagerung im Bereich des Embryosacks81
4.2.2.	Calciumeinlagerung in den Samenanlagen nach induzierter Bestäubung83
4.3.	Samenentwicklung85
4.4.	Samenqualität86
4.4.1.	Inhaltsstoffe als „innere Qualität“ der Samen86
4.4.2.	Samengewicht, Keimfähigkeit und Triebkraft89
4.4.3.	Einfluss des Kapselalters auf die Samenqualität90
4.5.	Positionseffekte91
4.5.1.	Pollenschlauchwachstum und Embryosackflächenvergrößerung nach induzierter Bestäubung91

4.5.2.	Samenentwicklung	92
4.5.3.	Samenqualität	93
4.5.3.1.	Samengewicht	93
4.5.3.2.	Inhaltsstoffe im Samen	94
4.5.3.3.	Keimfähigkeit und Triebkraft	95
4.6.	Beziehungen zwischen Samenanlagenqualität und Samenqualität	96
4.7.	Beziehungen zwischen den Samenparametern mit Keimfähigkeit und Triebkraft	97
4.8.	Schlussfolgerungen und Ausblick	98
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	104

A.O.A.	(average object area) mittlere Größe
AB	Anthesebeginn
Abw.	Abweicher
bzw.	Beziehungsweise
cv	Variationskoeffizient
cv ES	Embryosackheterogenität
ES	Embryosack
FDA	Fluoresceindiacetat
FM	Frischmasse
IGZ	Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren / Erfurt e.V.
MW	Mittelwert
n	Anzahl
PS	Pollenschlauch
R.O.A.	(relative object area) Dichte
REM	Rasterelektronenmikroskop
SK	Einzelpflanzenklon „Sylvia“
SP	Population „Sylvia“
SS	Selbstungsnachkommen einer Einzelpflanze „Sylvia“
T.O.A.	(total object area) Gesamtfläche
TK	Tetraploider Klon
TnA	Tage nach Anthesebeginn
TnB (DaP)	Tage nach Bestäubung (Days after Pollination)
TvA	Tage vor Anthesebeginn

1 Einleitung und Zielstellung

Die züchterische Bearbeitung von *Cyclamen persicum* cv. ist von historischer Bedeutung. Sie begann vor ca. 150 Jahren. Nach wie vor werden *Cyclamen* ausschließlich über Samen vermehrt. Auch heute haben die *Cyclamen* mit Stückzahlen von ca. 25 bis 30 Millionen verkauften Pflanzen in Deutschland¹ noch immer einen wirtschaftlich hohen Stellenwert. In Deutschland bilden sie damit 10 % der Gesamtjahresproduktion an Fertigware bezüglich blühender Topfpflanzen unter Glas. So betrug im Jahr 2000 die Anbau- bzw. Aufstellfläche für *Cyclamen* in Deutschland 168,4 ha. Dies sind allein 13% der Gesamtanbau- bzw. Aufstellfläche für blühende Topfpflanzen unter Glas in Deutschland. Im Freistaat Thüringen werden jährlich 881000 *Cyclamen* als Fertigware produziert. Dies entspricht ca. 15% der Gesamtjahresproduktion an blühenden Topfpflanzen unter Glas. Bezüglich der Gesamtanbau- und Aufstellfläche für blühende Topfpflanzen unter Glas werden in Thüringen mit 6,3 ha allein 31% für den *Cyclamen*anbau benutzt. Im Jahr 2000 bauten 155 Betriebe blühende Topfpflanzen unter Glas an, deutschlandweit waren es 5493 Betriebe¹.

Das setzt eine hohe Vermehrungsrate in den Züchtungs- und Produktionsbetrieben voraus, um den Bedarf an Topfpflanzen decken zu können. Hierbei spielen vor allem wirtschaftliche Erwägungen eine große Rolle. Zum einen besteht ein Ziel darin, hohe Saatgutmengen unabhängig vom verwendeten Genotyp zu erzeugen. Allerdings zeigen sich in der Praxis Unterschiede zwischen Genotypen und Anbaujahren, ohne dass die Ursachen hierfür hinreichend bekannt sind. Darüber hinaus soll mit einer definierten Saatgutmenge eine stabile Anzahl an Nachkommen erzielt werden. Das setzt eine hohe Qualität des Saatgutes bezüglich seiner Keimfähigkeit und Triebkraft voraus. In der gärtnerischen Praxis aber sind Keimraten von nur 60 bis 70 % keine Seltenheit.

So muss neben dem Ertrag auch die Qualität des Saatgutes optimiert werden. Beide sind deshalb nicht unabhängig voneinander zu betrachten. Ertrag und Qualität wiederum, sind im Zusammenhang mit Morphologie, Physiologie und Genetik des Samenträgers in Wechselwirkung mit Umweltfaktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Licht und Kultivierungsmaßnahmen zu sehen.

Frühere Untersuchungen zu Ertrag und Qualität von *Cyclamen persicum* Saatgut ergaben, dass die Anzahl der sich nach der Befruchtung entwickelten Samen zwischen Genotypen aber auch zwischen Einzelpflanzen einer Population und sogar innerhalb einer Einzelpflanze stark variierte. Darüber hinaus zeigten Keimversuche, dass auch die Aussaaten in der Regel differenziert aufliefen obwohl gleiche Ernte und Lagerbedingungen gewährleistet waren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Samenanlagen der Vertreter der Myrsinaceae anatrop, bitegmisch und tenuinucellat sind, mit einer Mikropyle, welche von beiden Integumenten geformt wird (Johri et al. 1992). Außerdem ist die Organisation des Embryosacks vom Polygonumtyp. Des Weiteren besitzen sie nukleäres Endosperm und produzieren eiweißhaltige Samen. Die Plazenta, der *Cyclamen*, ist multiovulat. Die Samenanlagen sind radiär um die Plazenta angeordnet (Abb.1).

¹ Statistisches Bundesamt, Fachserie 3, R 3.1.6.2000



Abb.1. Darstellung der generativen Organe bei *Cyclamen persicum*, (links) Gynoezeum, (rechts) Plazenta mit Samenanlagen.

Bislang wurden anatomische Untersuchungen nicht unter dem Aspekt der Ursachenfindung für Unterschiede im Saatgutertrag und der Samenqualität durchgeführt.

Von anderen Pflanzenfamilien und Gattungen ist bekannt, dass sich nicht alle zur Verfügung stehenden Samenanlagen zu reifen Samen entwickeln (Rodrigo und Herrero 1997, Akhalkatsi et al. 1999). Zum einen wird dieses Phänomen als Ausdruck einer evolutionär essenziellen, sexuellen Selektion gewertet. Dafür spricht, dass die Nährstoffressourcen der Mutterpflanze begrenzt sind, und somit nur ein Teil der Samenanlagen optimal versorgt werden kann. Deshalb kommt es zu einer Konkurrenzsituation der Samenanlagen untereinander. Diese Konkurrenzsituation erfahren die Samenanlagen gleich mehrfach. Vor allem vor der Befruchtung muss in der Samenanlage bzw. im Embryosack die biochemische Zusammensetzung des Zytoplasmas optimal für ein Eindringen des Pollenschlauchs sein. Dies wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Proteinen, Kohlenhydraten und anorganischen Substanzen erreicht (Raghavan 2000). Auch nach der Befruchtung sind die Samenanlagen auf die Ernährung durch die Mutterpflanze angewiesen. Vielfach wird berichtet, dass hierbei der größte Konkurrenzdruck besteht. So wird bei *Quercus suber* L. von sechs Samenanlagen nur eine (in Ausnahmefällen zwei) Samenanlage befruchtet (Boavida et al. 1998). Diese entwickelt sich zu einem reifen Samen, und hemmt dabei die Entwicklung der anderen. Auch wenn zwei Samenanlagen befruchtet werden, entwickelt sich nur eine weiter, die andere degeneriert. Weiterhin wird berichtet, dass bei *Cerasus vulgaris* Mill. ein geringer Saatgutertrag u.a. auf eine hohe Anzahl von degenerierten Samenanlagen oder anomal entwickelten Embryosäcken zurückgeführt werden kann (Dys 1984). Auch an Buchweizen (*Fagopyrum* sp.) konnte gezeigt werden, dass an anomalen Embryosäcken eine Befruchtung ausbleibt (Obendorf et al., 1992). Bei *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae) entwickeln sich gewöhnlich nur 50% der vorhandenen Samenanlagen zu reifen Samen (Gomez und Zamora 2003).

Darüber hinaus sind aber auch die Prozesse der Samenanlagenentwicklung von Bedeutung für die weitere Samenentwicklung und -reifung. Es gibt Hinweise dafür, dass zum Zeitpunkt der Anthese nicht alle Samenanlagen an einer Plazenta homogen entwickelt sind (Sage et al. 1999).

Auch bei Untersuchungen an Samenanlagen von *Prunus armeniaca* gab es eine große Variabilität hinsichtlich des Entwicklungszustandes (Alburquerque et al. 2002). Hier wurde vor allem eine genotypenabhängige Entwicklung des Embryosacks zum Zeitpunkt der Anthese festgestellt. Auch bei *Butomus umbellatus* wurde eine ausbleibende Befruchtung an deformierten oder unvollständig entwickelten Samenanlagen beschrieben (Fernado und Cass 1997). Untersuchungen am IGZ ergaben, dass bei *Cyclamen* höhere Erträge erzielt wurden, wenn mehrmalige Bestäubungen an den Pflanzen stattfanden (unveröffentlicht). Dies ist unter Umständen als Hinweis auf unterschiedliche Entwicklungsstufen der Samenanlagen einer Plazenta zu Anthesebeginn zu sehen. Auch bei *Pistacia vera* wird berichtet, dass zum Zeitpunkt der Anthese die Samenanlagen noch unreif sind und erst, wenn der Pollenschlauch die Samenanlage erreicht, ein reifer Embryosack vorliegt (Martinez-Palle, Herrero 1998).

Neben den Samenanlagen unterliegen aber auch die Pollenkörner bzw. Pollenschläuche einem starken Konkurrenzdruck. Dies zeigt sich an der Ausdünnung der Pollenschläuche auf ihrem Weg durch den Griffel bis hin zu den Samenanlagen (le Roux et al. 1996). Plitmann (1993) macht dafür die unzureichende Versorgung aller Pollenschläuche beim Durchwachsen des Griffels verantwortlich. Dies ist zurückzuführen auf die begrenzte Nährstoffverfügbarkeit im Griffel während des Pollenschlauchwachstums (Herrero und Hormaza 1996). Dies wird als notwendiger Evolutionsfaktor gewertet, so auch bei *Turnera ulmifolia* (Baker und Shore 1995). Entscheidend ist hierbei auch das so genannte Pollenkörner-Samenanlagen-Verhältnis. Das bedeutet, dass die Vielzahl der Pollenkörner in Bezug auf die zahlenmäßig geringer vorhandenen Samenanlagen einem hohen Konkurrenzdruck unterworfen sind (Plitmann 1993), wenn man davon ausgeht, dass immer nur ein Pollenschlauch in eine Samenanlage einwächst.

Bezüglich der Qualitätsmerkmale reifer Samen konnte bei *Primula* sp. ein Zusammenhang zwischen Samengewicht und Samenzahl pro Kapsel nachgewiesen werden (Tremayne, M.; Richards, A. J. 2000). Außerdem keimten Samen mit höherem Gewicht schneller, und die Keimlinge entwickelten sich besser. Auch bei *C. persicum* fand man einen Zusammenhang zwischen Samengewicht und Keimfähigkeit (Lee und Lee 1986). Ähnliches konnte bei *Ulex* sp. gezeigt werden (Gutierrez et al. 1996). Hier gab es einen Zusammenhang zwischen Samengewicht und Gewicht des Keimlings in Abhängigkeit von der Position der Samenanlage an der Plazenta. Offensichtlich ist auch der Reifezustand der Samen für die Keimfähigkeit von entscheidender Bedeutung, wie Untersuchungen an *C. persicum* belegen (Corbineau et al. 1989 a, b). Unterschiedliche Reifezustände der Samen wurden an *Cyclamen* bislang noch nicht analysiert.

Um Ursachen für Reife-, Ertrags- und Qualitätsunterschiede im Saatgut zu erkennen, ist es deshalb notwendig, mit dem Studium der Reproduktionsstrukturen und -prozesse bereits vor der Befruchtung und in frühen Phasen der Samenentwicklung zu beginnen, um zu klären, ob bereits in diesen Phasen die Qualität sowie der Ertrag des Saatgutes prädestiniert sind.

Ziel der Untersuchungen ist es deshalb vor allem, Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen der Samenanlagen in Abhängigkeit vom Genotyp der Mutterpflanze zu analysieren. Von Samenanlagen wird hierbei so lange gesprochen, bis sie sich im Zustand der Reifung als Samen von der Mutterpflanze trennen (Straßburger 1999). Dazu erfolgen zunächst anatomisch-morphologische Untersuchungen an den Samenanlagen, um grundlegende Kenntnisse über den Aufbau und die Entwicklungsprozesse des generativen Apparates zu erlangen.

So sollen neben der Definition des Samenanlagentypus der *Cyclamen* auch Feinstrukturen, wie die Mikropyle, der Embryosack und der Eiapparat genauer untersucht werden. Erste Anhaltspunkte liefern bereits einige unter diesem Gesichtspunkt durchgeführte Arbeiten an *Cyclamen sp.* (Casper 1956).

Große Bedeutung haben hierbei insbesondere Untersuchungen zur Homo- oder Heterogenität der Samenanlagenentwicklung an der Plazenta. Dabei werden in vorliegender Arbeit neben Veränderungen der Samenanlagenstruktur auch physiologische Prozesse in verschiedenen Entwicklungsstufen analysiert, um festzustellen, inwieweit Unterschiede in der Samenanlagenentwicklung existieren und welche Einflüsse sie auf die weitere Samenbildung ausüben. Im Vordergrund stehen dabei insbesondere Befunde zur Calloseeinlagerung im Bereich des Embryosacks und dessen Bedeutung für die Befruchtung und Entwicklung der Samenanlagen. Der genaue Antriebsmechanismus und der biologische Sinn der Calloseeinlagerung in den Samenanlagen konnten bislang noch nicht vollständig geklärt werden.

Weiterhin werden in diesem Zusammenhang Faktoren betrachtet, denen in Bezug auf Pollenschlauchwachstum und Befruchtung eine Attraktionsfunktion zugeschrieben wird. Vielfach fungiert intrazelluläres Calcium in der Samenanlage als möglicher Chemoattraktant. Versuche zur In-vitro-Fertilisierung in einem Calciumhaltigen Medium belegen, dass die Calciumkonzentration für die Gametenfusion von Bedeutung ist (Faure et al. 1994).

Des Weiteren wird die Vitalität des zur Bestäubung verwendeten Pollens untersucht und es wurden grundlegende Untersuchungen zum Pollenschlauchwachstum an der Plazenta durchgeführt.

Flowcytometrische Untersuchungen zur Samenentwicklung nach induzierter Bestäubung sollen Aufschluss über mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzen bzw. Samen einer Pflanze geben.

Bei den Untersuchungen zur Qualität des Samens wird im Folgenden zwischen innerer und äußerer Qualität unterschieden. Als inneres Qualitätsmerkmal wird vor allem die Inhaltsstoffakkumulation im Endosperm erachtet. In diesem Zusammenhang sollen im Besonderen der Kohlenhydratgehalt und der Gehalt an Speicherproteinen ermittelt werden. Die äußere Qualität des Saatgutes wird vor allem durch dessen Samengewicht sowie die Keimfähigkeit und Triebkraft bestimmt.

Bezüglich der Triebkraftprüfung ist zu bemerken, dass bislang kein standardisiertes Protokoll zur Durchführung und Beurteilung an Zierpflanzen, speziell *Cyclamen* sp. existiert, sodass hier zunächst eine Methode etabliert werden muss, die geeignet ist, eine zuverlässige Beurteilung der Triebkraft der Samen durchführen zu können.

Schließlich wird ermittelt, ob es Zusammenhänge zwischen der inneren und der äußeren Qualität des Saatgutes gibt. Des Weiteren geht es um die Frage, inwieweit die Qualität und der Ertrag des Saatgutes bereits in frühen Entwicklungsphasen der Samenanlagen prädestiniert sind.

Im Zusammenhang mit den genannten Zielstellungen soll ebenfalls analysiert werden, welchen Einfluss die Position der Samenanlage an der Plazenta sowie des Samens in der Kapsel auf die Samenentwicklung und -qualität ausübt.

Weiterhin ist es Ziel der Untersuchungen, basierend auf den grundlegenden Erkenntnissen, vergleichende Untersuchungen verschiedener Pflanzen eines Genotyps, aber auch zwischen den einzelnen Genotypen durchzuführen, um die Bedeutung des Samenträgergenotyps für Ertrag und Qualität des Saatgutes bei *Cyclamen* zu beurteilen.

Dazu müssen zunächst Methoden zum Nachweis anatomisch-morphologischer Eigenschaften und physiologischer Prozesse der Samenentwicklung entwickelt werden. Des Weiteren muss eine Methode etabliert werden, um die genannten ausgewählten Sameninhaltsstoffe zu quantifizieren.

Schließlich geht es um die Ermittlung von Samen- bzw. Samenanlagenattributen, die als Indikatoren für die Qualität bzw. den Ertrag geernteter Samen ursächlich sind.

2 Material und Methoden

2.1. Material

Das für die Untersuchungen ausgewählte Pflanzenmaterial stammte aus der Kulturform von *Cyclamen persicum* Sorte „Sylvia“. Diese Sorte ist für die gartenbauliche Praxis wirtschaftlich sehr bedeutsam. Die Pflanzen innerhalb der Sorte sind sehr heterogen in ihren Merkmalen. Durch die Einbeziehung verschiedener Genotypen mit genetisch homologen Individuen innerhalb der Genotypen sowie mit unterschiedlicher genetischer Variation zwischen den Genotypen, sollte zum einen die Homologie des Untersuchungsmaterials gegeben sein und zum anderen sollte geklärt werden, inwieweit der Genotyp der Mutterpflanze für die Ausprägung von Merkmalen relevant ist. Die Einteilung des Ploidigrades für die untersuchten Genotypen folgt der in der gartenbaulichen Praxis üblichen Bezeichnung, diploid für $2n = 48$ Chromosomen und tetraploid für $4n = 96$ Chromosomen.

Zur Verfügung standen 10 Pflanzen, die durch Verklonen einer Einzelpflanze der diploiden Sorte „Sylvia“ entstanden waren, sowie 20 durch Aussaat entstandene Selbstungsnachkommen einer Einzelpflanze. Darüber hinaus wurden 20 Pflanzen aus einer Population der Sorte „Sylvia“ und 10 Pflanzen eines tetraploiden Klon verwendet. Die Klone der diploiden Sorte „Sylvia“, sowie der tetraploide Klon wurden über ein Verfahren der somatischen Embryogenese generiert (Schwenkel und Winkelmann 1998).

Tab. 1. Klassifizierung der Untersuchungsobjekte von *Cyclamen persicum*

Genotyp	Herkunft der Pflanze	Chromosomenanzahl	Alter der Pflanzen zu Beginn der Untersuchungen	Bezeichnung
Einzelpflanzenklon „Sylvia“	Somatische Embryogenese (IGZ)	$2n = 48$	2 Jahre	SK
Selbstungsnachkommen einer Einzelpflanze „Sylvia“	Über Samen vermehrt (IGZ)	$2n = 48$	1 Jahr	SS
Population „Sylvia“	Firma Bachmann (Erfurt)	$2n = 48$	1 Jahr	SP
Tetraploider Klon	Somatische Embryogenese (IGZ)	$4n = 96$	1 Jahr	TK

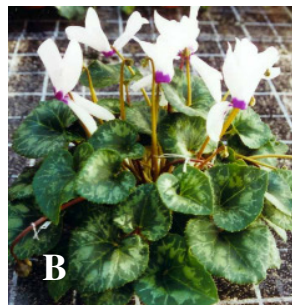
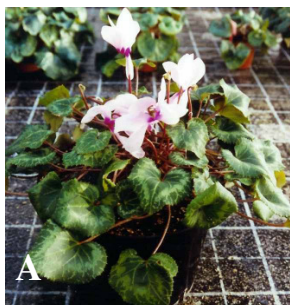


Abb. 2. Genotypen, A) SK, B) SS, C) SP, D) TK.

2.1.1. RAPD-PCR Untersuchungen

Aufgrund der unterschiedlichen Herkünfte des Materials wurden die diploiden Pflanzen vor den Untersuchungen mittels RAPD-PCR auf ihre verwandtschaftlichen Beziehungen überprüft. Es fanden hierbei die Primer A 02, A 03, A 07, A 11, A 13, A 15, B 01, B 03, C 02, C 04, C 05, C 06, C 18, C 19, C 20, D 02, D 03 und D 13 der Firma ROTH Anwendung. Im Ergebnis zeigte sich, dass die verwendeten diploiden Genotypen in enger verwandtschaftlicher Beziehung zueinander stehen, wobei die Genotypen SK und SS erwartungsgemäß vermutlich stärker miteinander verwandt sind (Abb.3).

Die RAPD-PCR Untersuchungen wurden in der Biotechnologie des IGZ / Kühnhausen nach dem dort verwendeten Standardprotokoll für *Cyclamen* durchgeführt.

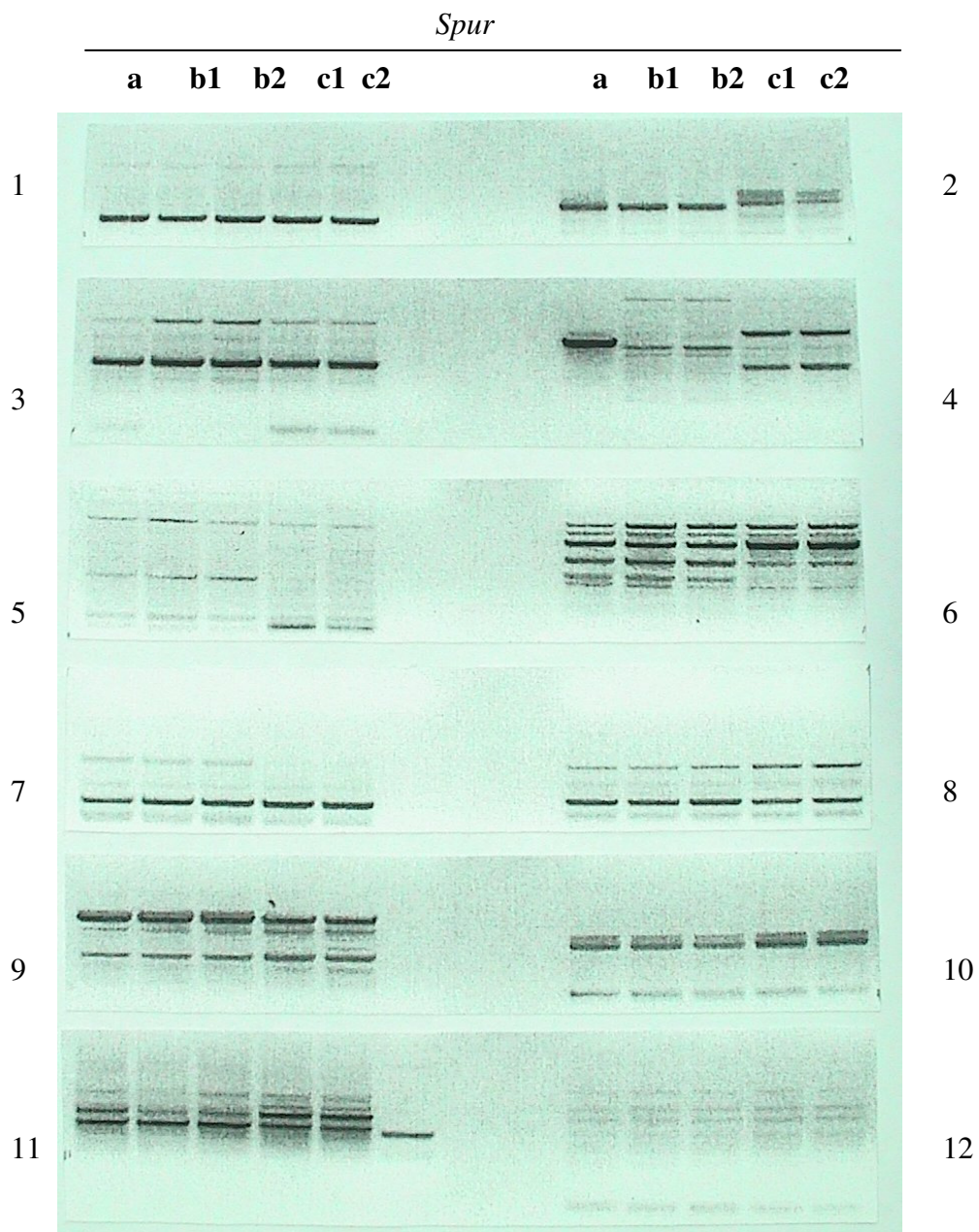


Abb. 3. RAPD - PCR Pherogramme, Spur: a - SK, b1u.2 - SS, c1u.2 - SP, Primer: 1-C20, 2-D13, 3-C03, 4-D03, 5-C02, 6-C04, 7-A11, 8-C18, 9-B01, 10-B03, 11-A03, 12-A07.

2.1.2. Kultivierungsbedingungen

Die Pflanzen wurden unter annähernd konstanten Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen kultiviert. Für die Versuchsjahre 2002 und 2003 ergaben sich folgende Werte (Tab.2).

Tab. 2. Klimadaten der zwei Versuchsjahre 2002 und 2003.

Versuchsjahr	Temperatur °C			Relative Luftfeuchte (MW) %		
	Min	Max	Mittelwert	Min	Max	Mittelwert
2002	15,0	40,1	18,7	14,1	88,9	61,8
2003	8,3	35,3	18,1	11,8	56,8	56,8

Über eine automatische Tischbewässerung, die dem Nährstoffbedarf von *Cyclamen* angepasst war, wurden die Pflanzen regelmäßig gedüngt. Substratanalysen zur Untersuchung des Düngungszustandes der diploiden Pflanzen ergaben folgende Werte (Tab. 3).

Tab. 3. Ergebnisse der Substratanalysen der diploiden Genotypen.

Bezeichnung	NO ₃ -N	P	K	pH	Salzgehalt	Vol.gewicht
Genotyp	mg/l Bod	mg/l Bod	mg/l Bod	CaCl ₂	g KCL/l Bod	g/100ml Bod
SK	287	127	12	6,3	5,46	48
SS	456	318	72	5,66	7,44	48
SP	356	449	26	5,63	4,59	29

2.2. Methoden

2.2.1. Bestäubungsexperimente

Bedingt durch das Blühverhalten der Genotypen wurden die Bestäubungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

Die SK wurde von Anfang Juli 2002 bis Anfang Februar 2003 bestäubt. Der Bestäubungszeitraum für die Genotypen SS und SP erstreckte sich von Mitte November 2002 bis Anfang Februar 2003. Der Genotyp TK wurde von Ende November 2002 bis Anfang Februar 2003 bestäubt. Jede Blüte wurde einmal bestäubt und durch Isolierung mittels Aluminiumfolie gegen ungezielte Fremdbestäubungen geschützt. Die Bestäubungen wurden in aufsteigender numerischer Reihenfolge durchgeführt. Die Ernte der Kapseln fand nach ca. 3 Monaten statt, nachdem die Versorgung durch die Mutterpflanze physiologisch unterbrochen wurde. Deutlich zu erkennen war dies am Weichwerden der Fruchtsiele. Auf Grundlage der Bestäubungsreihenfolge wurde das Alter der Kapseln festgelegt (Tab. 4).

Tab 4. Altersbezeichnung der Kapseln auf der Grundlage von Bestäubungsreihenfolge und Bestäubungsmonat bei den Genotypen SP und SS.

Bezeichnung Alter der Kapsel	Zeitpunkt der Bestäubung
1	Mitte November 2002
2	Ende November 2002
3	Dezember 2002
4	Anfang Februar 2003
5	Ende Februar 2003

Die mit 1 bezeichneten Kapseln wurden demnach in der zeitlichen Reihenfolge zuerst und die mit 5 bezeichneten Kapseln zuletzt bestäubt.

2.2.2. Untersuchungen zur Pollenvitalität

Vor den Bestäubungen wurden von allen Genotypen Untersuchungen zur Pollenvitalität durchgeführt. Der dafür verwendete Pollen stammte aus geschlossenen Blüten 1 bis 3 Tage vor Anthesebeginn und aus frisch geöffneten Blüten.

Die aus den Blüten herauspräparierten Antheren kamen in einen Exsikkator auf Kieselgel und wurden bei Raumtemperatur 48 Stunden getrocknet. Anschließend erfolgte die Gewinnung der Pollenprobe auf einem Schüttler. Danach wurde die Probe in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit und Zimmertemperatur für 24 Stunden rehydriert. Der experimentelle Nachweis der Pollenvitalität erfolgt durch den Nachweis der Esteraseaktivität mittels FDA (Knox et al. 1986).

Dabei wurde eine FDA-Lösung mit Zugabe einer 0,5%igen Saccharoselösung verwendet (Werther 1998). Das Pollengemisch wurde in dieser Lösung auf dem Objektträger vorsichtig verteilt und anschließend unter Auflichtfluoreszenz untersucht. Von jedem Genotyp wurden je Variante 3 Wiederholungen durchgeführt. Zur Auswertung kamen jeweils 300 Pollenkörner. Dabei galten grün-gelb fluoreszierende Pollenkörner als vital und schwach bzw. nicht fluoreszierende als nicht vital.

2.2.3. Untersuchungen zu anatomisch-morphologischen sowie physiologischen Merkmalen unbefruchteter sowie befruchteter Samenanlagen

2.2.3. 1. Präparation der Objekte

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die zufällig ausgewählten Samenanlagen direkt unter einem Stereomikroskop von der Plazenta abpräpariert und auf Leittaps fixiert. Die luftgetrockneten Präparate wurden anschließend unter Argonatmosphäre mit einer 25 bis 30 nm dicken Goldschicht im Sputtergerät SCD 005 der Firma BAL TEC besputtert.

Für die auflichtmikroskopischen Untersuchungen, wie Calciumakkumulation und Feinstrukturanalysen an den Samenanlagen, sowie Endospermuntersuchungen am Samen wurden Mikrotom-Dünnschnitt-Präparate angefertigt. Die Objekte wurden in Glycol-Methacrylat für GMA-Dünnschnitt-Technik eingebettet. Nach stufenweiser Dehydrierung in Ethanol (70%-90%-96%-100%) erfolgte die Präinfiltration mit dem kalt polymerisierenden Kunststoff Technovit 7100 (Lot. 020250 der Firma Heraeus Kulzer). Die Infiltration der Objekte wurde mittels der Präinfiltrationslösung und in Folge der Zugabe von Dibenzoylperoxid (Technovit 7100, Härter 1, Lot. 05442, Heraeus Kulzer) durchgeführt. Die Einbettung der Objekte in Teflonformen (Histoform E, Heraeus Kulzer) erfolgte in der Infiltrationslösung nach Zugabe von Technovit 7100 Härter 2 (Lot. 010149, Heraeus Kulzer). Schließlich wurde die Blockbildung auf einem Trägerblock (Histobloc, Heraeus Kulzer) durch den schnell härtenden Kunststoff Technovit 3040 (Pulver Lot. 011695 und Flüssigkeit Lot. 060600, Heraeus Kulzer) durchgeführt. Anschließend wurden die Objekte mittels Rotationsmikrotom (Jung CM 1800 der Firma Leica) in 7 µm dicke Schichten geschnitten.

Es wurden bezüglich der Untersuchungen zur Calciumakkumulation in den Samenanlagen fünf verschiedene Untersuchungszeiträume gewählt. Diese waren zu Anthesebeginn (AB), 1 Tag nach Bestäubung (1TnB), 3 Tage nach Bestäubung (3TnB), 5 Tage nach Bestäubung (5TnB) sowie 7 Tage nach Bestäubung (7TnB). Je Untersuchungszeitraum wurden pro Genotyp je 5 verschiedene Blüten analysiert, sodass ein Gesamtvolumen von 25 Blüten je Genotyp, insgesamt also ein Probenumfang von 100 Blüten entstand.

Zusätzlich wurden für auflichtmikroskopische Untersuchungen zur Samenanlagenstruktur, diese chemisch aufgehellte bzw. transluzent aufgeschlossen. Für diese Präparation wurde die Clearing Technik nach Herr (Herr 1971) modifiziert (Mol et al. 1994, Palser 1992) angewendet. Die Clearinglösung bestand aus Milchsäure, Chloralhydrat, Phenol, Nelkenöl, Xylen und Benzylbenzoat ($C_{14}H_{12}O_2$, Lot. 120K0042, E.C. No 204-402-9, Sigma) im Verhältnis 2:2:2:2:1:1. Zuvor wurden die Plazenten 24 Stunden in FPA₅₀ (Formalin/Propionsäure und Ethanol 50%) fixiert und anschließend in 70 % Ethanol überführt. Die Samenanlagen wurden danach in absolutem Ethanol dehydriert und anschließend für 1-2 Stunden, in der Clearing Lösung aufbewahrt.

Die Untersuchung erfolgt mittels DIC (Nomarski) Lichtmikroskopie.

Die Präparation der Objekte für die durchlicht-bzw. fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Analyse der Embryosackmorphologie, Calloseeinlagerung in den Samenanlagen, sowie des Pollenschlauchwachstums wurde folgendermaßen durchgeführt. Die Plazenten wurden aus frischem Blütenmaterial herauspräpariert und in einer anilinblauhaltigen Lösung nach Naether (1971) im Wasserbad bei 100°C für 5 min. gekocht. Danach wurden die Plazenten vorsichtig auf einem Objektträger in Propantriol gequetscht. Diese Art der Präparation wurde für die anschließende Callosebonitur sowie des Pollenschlauchwachstums unter UV-Lichtanregung bzw. zur Untersuchung der Embryosackheterogenität mittels Dunkelfeldmikroskopie durchgeführt.

Für die Untersuchungen zur Embryosackheterogenität standen von allen Genotypen 10 Pflanzen zur Verfügung. Von jeder Pflanze wurden jeweils 5 Blüten untersucht, sodass insgesamt je Genotyp 50 Blüten in die Untersuchung einbezogen wurden. Es wurden von jeder Blüte bzw. jeder Plazenta mindestens 100 Samenanlagen bezüglich der Embryosackfläche analysiert, sodass ein Gesamtumfang von 5000 Samenanlagen je Genotyp für diese Untersuchung entstand. Insgesamt wurden ca. 20.000 Samenanlagen analysiert.

Für die Callosebonitur wurden vier verschiedene Untersuchungszeiträume gewählt. Diese sind im Einzelnen, 3 Tage vor Anthesebeginn (3TvA), Anthesebeginn (AB), 3 bis 5 Tage nach Anthesebeginn (3-5TnA) sowie 10 Tage nach Anthesebeginn (10TnA). Bei den Genotypen SK, SS und SP wurden je Untersuchungszeitraum 30 Blüten analysiert. Je Blüte wurden mindestens 100 Samenanlagen untersucht, sodass für die diploiden Genotypen ein Untersuchungsumfang von 3000 Samenanlagen je Genotyp und Untersuchungszeitraum, und insgesamt von 9000 Samenanlagen entstand. So wurden in allen Untersuchungszeiträumen somit zusammen 36000 Samenanlagen bezüglich der Stärke der Calloseeinlagerung bonitiert. Beim Genotyp TK betrug der Untersuchungsumfang für die Zeiträume 3TvA und AB jeweils 30 Blüten, 3-5 TnA, 18 Blüten und 10 TnA nur 8 Blüten. Die Unterschiede im Probenumfang kommen durch das unzureichende Blütenaufkommen bei TK zustande. Für die Erfassung der Abweicher aus der Callosesynthese wurden alle Präparate untersucht, die zuvor bezüglich der Stärke der Calloseeinlagerung bonitiert wurden.

2.2.3. 2. Mikroskopische Färbemethoden

Für die grundlegenden zytologischen Untersuchungen wurden die Dünnschnitte progressiv mit Mayers-Hämalaunlösung ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, Lot. OB 141458, C.I.75290, Merck) gefärbt und anschließend in Leitungswasser gebläut (Braune et al. 1976). Danach erfolgte die Einbettung in Euparal.

Die Dünnschnitte wurden für die Untersuchung der Calciumakkumulation in den Samenanlagen mit Alizarin Red S ($\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_7\text{SNa}$, Lot. 121K2503, E.C.No 204-981-8, C.I. 58005, Sigma-Aldrich) selektiv angefärbt. Dazu wurde 2%iges Alizarin Red S in destilliertem Wasser, pH 6-7, mit Ammoniumhydroxidlösung versetzt (Smith und Bruton 1979, Kiernan 1990, Mori et al. 2000, Lazcano et al. 1992). Anschließend erfolgte auch hier die Einbettung in Euparal. Zum unspezifischen Lipidnachweis im Endosperm wurde eine Sudanschwarzlösung verwendet. Dafür wurden 3,5g Sudanschwarz ($\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{N}_6$, Lot. A014721801, Acros organics) in 250 ml 70%igen Ethanol gelöst und auf 56°C erhitzt. Der Farbstoff wurde danach eine Stunde auf diesem Temperaturniveau gehalten und anschließend in ein leicht verschlossenes Gefäß filtriert (Kiernan 1990). Die Mikrotomdünnschnitte wurden zunächst in 70% Ethanol aufgefangen und anschließend für 10 Minuten in Sudanschwarz gefärbt. Danach erfolgte die Auswaschung in 70% Ethanol und Wasser. Schließlich wurden die Objekte in Propantriol eingebettet. Die Analyse der Lipide im Endosperm wurde an einer Kapsel des Genotyps SP in 3 Wiederholungen je Position durchgeführt.

Zum mikroskopischen Nachweis von Speicherproteinen im Endosperm wurden Schnitte unmittelbar in BRADFORD Reagenz (Lot. 033K9279, Sigma) eingebettet und analysiert (Bradford 1976). Die mikroskopischen Untersuchungen zur Konzentration der Speicherproteine im Samen wurden an zwei Genotypen durchgeführt. Dabei wurden je Position mindestens 3 Wiederholungen an einer Kapsel durchgeführt.

Der unspezifische Nachweis von Kohlenhydraten im Endosperm erfolgte mit Iod Kalium Iodid Lösung und in Lugolscher Lösung an zufällig ausgewählten Samen (Lot. OB319102, I:K 1:2, Merck), (Braune et al. 1987).

2.2.3. 3. Mikroskopische Untersuchungen

Die rasterelektronenmikroskopischen Arbeiten wurden in der Pathologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

Die Untersuchung erfolgte am Rasterelektronenmikroskop LEO 1450 (Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Für die auflicht -, durchlicht -, sowie fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen stand ein Forschungsmikroskop Leitz DMRB (Firma Leica, Deutschland) zur Verfügung. Dabei wurden die Untersuchungen mittels Dunkelfeld, Hellfeld, Nomarski und UV-Anregung durchgeführt.

Für Übersichtsaufnahmen zur Struktur der generativen Organe wurde ein Stereomikroskop Wild M3Z der Firma Leica (Deutschland) verwendet.

2.2.4. Computerunterstützte Bildanalyse

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera POLAROID E-DMC low light (POLAROID, USA, Deutschland) angefertigt und direkt in den PC überspielt und mit einem Bildanalysesystem analySIS 3.1 (1998) von Soft Imaging System GmbH, (Deutschland) weiterbearbeitet. Für die Farbauswertung der Callosebonitur wurde das Bildbearbeitungsprogramm Paint Shop Pro 4.15 von Jasc Software verwendet.

Die Flächenvermessung der Embryosäcke, sowie die Feststellung der Lipid-, Kohlenhydrat- und Proteindichte im Endosperm erfolgten nach der planimetrischen Methode mit dem CellExplorer2001 der Firma BioSciTec, (Deutschland). Diese Methode ermöglicht eine zuverlässige Kalkulation der Gesamtfläche oder Gesamtdichte der Probe, basierend auf einem kleineren mikroskopischen Ausschnitt des Gesamtobjektes (le Gal et al. 1984, Toth 1982).

2.2.5. Position der Samen in der Kapsel

Anatomisch- morphologische und physiologische Untersuchungen, Untersuchungen zur Entwicklung und Differenzierung der Samenanlagen, Versuche zur Keimfähigkeit und Triebkraft sowie die

Analysen des Samengewichts und der inneren Qualität der Samen erfolgten außerdem unter Berücksichtigung der Position in der Samenkapsel.

Dabei wurde zwischen den zwei Positionen apikal und basal unterschieden (Abb.4).

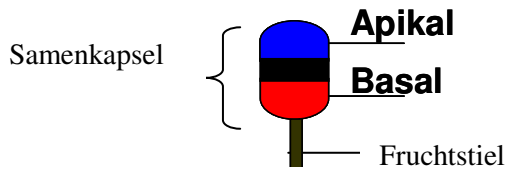


Abb. 4. Schema der Positionen apikal und basal an der Samenkapsel.

2.2.6. Analyse der löslichen Proteine

Die Analyse der löslichen Proteine im Samen erfolgte nach der BRADFORD-Methode (Holtzhauer 1997, Appenroth et al. 1982, Bradford 1976).

Die Messung wurde am Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, Deutschland) bei einer Extinktion von E_{595} nm gegen einen Blankwert aus Aqua dest. durchgeführt. Die Kalibrierung des Spekols erfolgte mit einer Protein Standard Reihe aus Rinderserumalbumin (Protein Standard-Bovine Serum Albumin, Lot. 091K8805, 2mg BSA, 0,9% NaCl, 0,05% sodium azide, Sigma) in den Konzentrationen 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 und 15 μ g Protein. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurden die Extinktionswerte mit dem zuvor ermittelten Faktor 27,383 multipliziert.

Die Probenvorbereitung erfolgte nach zwei Methoden. Zum einen wurde der Samen mittels Schleifpapier vollständig zermahlen, zum anderen erfolgte die Extraktion der löslichen Proteine im warmen Wasser.

Schleifpapiermethode

Reife Samen wurden mittels Schleifpapier (Körnung 240) vollständig zermahlen und anschließend mit 1 ml Aqua dest. versetzt. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 2500 u/min für 5 min unter Raumtemperatur. 100 μ l des Überstandes wurden anschließend mit jeweils 1 ml BRADFORD Reagent (Sigma) versetzt. Nach ca. 2min. Reaktionszeit erfolgte die Extinktionsmessung bei E_{595} nm am Spekol 11, (Carl Zeiss, Jena) gegen einen Blankwert aus 100 % Aqua dest.

Zur quantitativen Analyse löslicher Proteine nach BRADFORD wurden in der Schleifpapiermethode vom Genotyp SK insgesamt 215 reife Samen untersucht. Diese stammten aus den zwei Pflanzen 1 und 2, wobei von Pflanze 1 insgesamt 65 Samen und von Pflanze 2 insgesamt 150 Samen analysiert wurden.

Heißwassermethode

Im Verlauf der Experimente wurde die oben beschriebene Schleifpapiermethode modifiziert.

Von Interesse war die Etablierung einer zerstörungsfreie Methode zur quantitativen Proteinanalyse nach BRADFORD. Dazu wurden die Samen in 1ml Aqua dest. in einer Temperatur von 55°C für 10 Minuten unter permanenter Bewegung erhitzt. Nach dem Erhitzen wurden 100 µl von der Suspension abpipettiert und auf Zimmertemperatur abgekühlt. Danach wurde die Lösung mit 1ml BRADFORD Reagent versetzt und ebenfalls bei E_{595} nm am Spekol 11 gegen Aqua dest. gemessen.

Die Untersuchung mit der Heißwassermethode wurde an den Genotypen SS, SK sowie SP durchgeführt. Je Genotyp wurden mindestens 100 reife Samen untersucht. Die Untersuchung erfolgte in Abhängigkeit von der Position in der Kapsel, sodass je Genotyp und je Position mindestens 50 Samen untersucht wurden. Die Samen je Genotyp stammten aus insgesamt 4 Pflanzen dieses Genotyps.

2.2.7. Kohlenhydratanalyse

Vor der Analyse wurden reife Samen gewogen und halbiert, sowie anschließend mit 2 ml Ethanol 80% versetzt. Danach erfolgte die fünfmalige Extraktion der Proben im 80°C heißen Wasser, wobei nach jedem Durchgang das Ethanol in die jeweiligen Sammelgefäße dekantiert wurde. 100 µl des Extraktes wurden in je 2 Verdünnungen und 3 Messwiederholungen in ELISA-Platten pipettiert. In jeder Platte wurde als Blankwert Aqua dest. verwendet. Außerdem wurden in jede Platte die Standardreihen Glucose, Fructose und Saccharose in den Konzentrationen 0,1; 0,5; 1; 3 und 5 µg pro 100 µl Aqua dest. pipettiert. Danach erfolgte die Trocknung der Platten über Nacht bei 55°C. Zur Ermittlung des Glucosegehaltes wurden jeweils 100 µl Glucosekit, bestehend aus 1 Flasche Enzymreagenz, 17 ml Aqua dest. und 4 ml Farbreagenz in die Platten pipettiert und anschließend bei 37°C für 15 min. dunkel inkubiert.

Danach wurden die Platten in einem Standard Mikroplattenleser (Spektrothermo, Tecan Deutschland GmbH) bei einer Extinktion von E_{492} nm gemessen. Für die Bestimmung des Fructosegehalts wurde zuvor eine Phosphoglucose-Isomerase-Lösung (EC 5.3.1.9 Sigma P-9544, 100 U/mg in 4 ml 0.2 M HEPES Puffer-pH 7.8) hergestellt und 20 µl davon in jede Platte pipettiert. Nach erneuter Inkubation für 15 min. bei 37°C im Dunkeln wurde wiederum bei 492 nm im Mikroplattenleser die Extinktion gemessen. Schließlich wurde für die Ermittlung des Saccharosegehaltes eine Invertaselösung hergestellt (EC 3.2.1.26 Sigma I-4504, 60 mg in 6 ml 0.1 M Citratpuffer-pH 6.0). In jede Platte wurde anschließend 20 µl Invertaselösung pipettiert und bei 37°C erneut für 15 min. dunkel inkubiert.

Die Extinktionsmessung bei E_{492} nm erfolgte auch hier am Mikroplattenleser. Schließlich wurden die Zuckergehalte anhand der Kalibriergeraden der sich ebenfalls auf den ELISA-Platten befindlichen Glucose-, Fructose- und Saccharosestandards berechnet.

Die Kohlenhydratanalyse an reifen Samen wurde am Genotyp SS durchgeführt. Die Analyse erfolgte auch hier wiederum in Abhängigkeit von der Samenposition. Je Position wurden 100 Samen untersucht, sodass ein Gesamtvolumen von 200 Samen entstand. Die 100 Samen je Position stammten aus 3 verschiedenen Einzelpflanzen des Genotyps SS.

2.2.8. Keimfähigkeits- und Triebkraftprüfung

2.2.8. 1. Prüfung in Kunststoffpetrischalen

Zunächst erfolgte die Prüfung der Keimfähigkeit in Kunststoffpetrischalen, welche vor dem Auflegen der Samen nicht speziell vorbehandelt wurden. Von jedem Genotyp wurden 4 x 50 Samen positionsabhängig aufgelegt. Die Prüfung der Keimfähigkeit war konform mit den ISTA-Vorschriften (Bekendam, Grob 1979).

Die Desinfektion der Samen erfolgte zunächst für 30 Sekunden in 70 % iger Ethanol, danach in einer 0,8 % iger Silbernitratlösung, welche mit einem Tropfen Tween 20 versetzt wurde. Schließlich wurden die Samen noch 3-mal in sterilisiertem Wasser gespült. Die Petrischalen wurden mit einer Lage schwarzen (Sartorius 150mm) und mit einer Lage weißem Filterpapiers (S&S 150 mm Nr.597) ausgelegt. Zur Befeuchtung der Schalen wurden 15 ml einer Lösung aus 0,4 % GA_3 und 0,15 % KNO_3 im Mischungsverhältnis 1:3 verwendet. Die Prüfung erfolgte im Keimschrank (WTB Binder, Deutschland) bei Dunkelheit und 20 °C sowie 75 % Luftfeuchte. Bonituren wurden 21, 28 und 35 Tage nach Auflegen der Samen durchgeführt. Für die Prüfung der Triebkraft gibt es seitens der ISTA keine Vorschriften, die für *Cyclamen* gelten. Daher wurden zur Analyse der Triebkraft vollständig gekeimte Keimlinge 35 Tage nach Auflegen gewogen.

2.2.8. 2. Prüfung in Glaspetrischalen

Zusätzlich wurden von allen diploiden Genotypen 4x50 Samen positionsabhängig in einem weiteren Keimversuch geprüft. Die Glaspetrischalen wurden vor der Benutzung autoklaviert. Die Vorbereitung und Durchführung der Keimfähigkeitsprüfung erfolgte analog zum eben beschriebenen Keimversuch. Zur Beurteilung der Triebkraft 35 Tage nach Auflegen der Samen wurden auch hier die normal gekeimten Keimlinge gewogen.

2.2.8. 3. Prüfung in Substrat

Verwendet wurde hierfür Einheitserde (terreau Professional Gepac, Werkverband e.V. VM 31074, Weißtorf, Ton, Perlitt, pH 6,0, Salz 1,3g/l, N 110 mg/l, P₂O₅ 130mg/l, K₂O 160 mg/l). Es wurden die Samen zur Keimung gebracht, bei denen zuvor der Gehalt der löslichen Proteine mittels Heißwassermethode festgestellt wurde (siehe 2.2.6.). Analysiert wurden Samen der Genotypen SS und SP. Die Keimfähigkeits- und Triebkraftprüfung erfolgte wiederum in Abhängigkeit der Samenposition.

Je Genotyp wurden 100 Samen verwendet. Die Saatgutdesinfektion geschah im 55°C heißen Wasser (IGZ unveröffentlicht).

Die Samen wurden in vorbereitete Pflanzlöcher gedrückt und vollständig mit Erde bedeckt. Zur Beurteilung der Triebkraft 42 Tage nach Auflegen der Samen wurden die einzelnen Teile des Keimlings differenziert gewogen. Dabei wurde zunächst zwischen oberirdischen (Kotyledonen und Spross) und unterirdischen Keimlingsteilen (Hypokotyl und Seminalwurzeln) unterschieden (Abb.5).

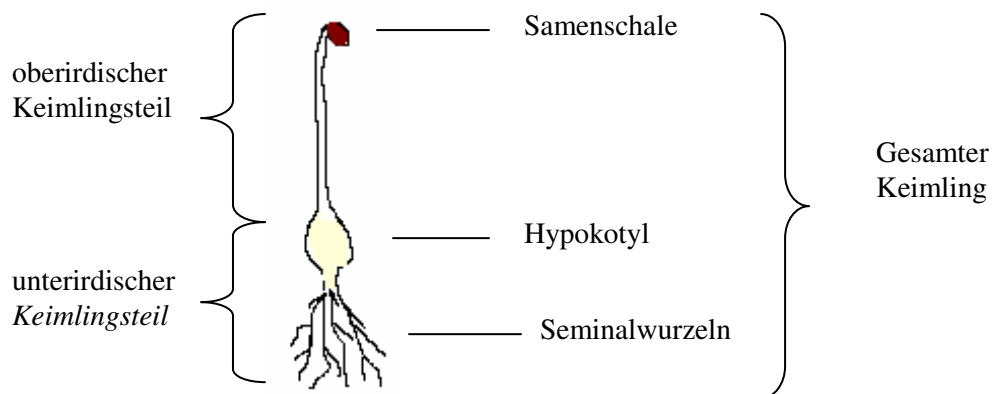


Abb. 5. Schema der verschiedenen Keimlingsteile zur Beurteilung der Triebkraft.

2.2.9. Flowcytometrische Analysen

Die Untersuchungen zur Samenentwicklung wurden am Flowcytometer PAII (Partec, Münster) durchgeführt (Bergounioux et al. 1992, Bergervoet et al. 1996, Sliwinska 2000). Die für die Analysen verwendeten Samenanlagen stammten aus Blüten des Genotyps SS, bei denen direkt zu Anthesebeginn eine Bestäubung induziert wurde. Die Abnahme der Kapseln erfolgte 32 Tage, 42 Tage, 49 Tage, 56 Tage sowie 63 Tage nach Bestäubung. Die Kapseln wurden direkt nach der Abnahme bis zur Bearbeitung in -86 °C gelagert. In jedem Untersuchungszeitraum wurden 5 Blüten von jeweils unterschiedlichen Einzelpflanzen geerntet. In jeder Blüte wurden 5-10 Samenanlagen positionsabhängig untersucht.

Die Präparation der Objekte erfolgte in gefrorenem Zustand. Einzelne Samenanlagen wurden von der Plazenta abpräpariert und in 400 µl Partec CyStain UV Precise Nuclei Extraction Lösung (Lot. Wd 030513, Partec GmbH, Germany), welche zuvor mit 1% Polyvinylpyrrolidon (Polyvidon 25, (C₆H₉NO)_n, Lot. K30434643314, Merck) versetzt wurde, in einer Petrischale eingebracht. Zur Zellkernextraktion wurden die Samenanlagen in dieser Lösung mit einer Rasierklinge auf Eis vollständig zerkleinert. Nach 2 Minuten wurden die Gewebeteile zusammen mit der Lösung mittels einer Einwegpipette durch 50 µm Nylon Filter in Plastikröhrchen überführt. Danach wurden 1600 µl der Partec CyStain UV Precise Staining buffer Lösung (Dapi staining, Lot. Ms 0983, Partec GmbH, Germany), welche wiederum mit 1% Polyvinylpyrrolidon versetzt wurde, in die Plastikröhrchen hinzugegeben. Nach weiteren 2 Minuten erfolgte die Messung am Flowcytometer. Es wurde jeweils eine definierte Zellzahl von 10000 analysiert.

2.2.10. Statistische Auswertungen

Zur statistischen Bearbeitung der Werte wurden die Programme Excel 97 (Microsoft) und Statistica 6.0 (Statsoft, Germany) verwendet.

Für das Merkmal Embryosackheterogenität wurden die Variationskoeffizienten in % aller untersuchten Blüten bzw. Plazenten aus dem Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert errechnet. Danach wurden die Mittelwerte der Variationskoeffizienten ermittelt und in einem Box-Whisker-Plot für jede Pflanze des entsprechenden Genotyps dargestellt. Für den Vergleich der Genotypen untereinander wurde der Gesamtmittelwert der Variationskoeffizienten jedes Genotyps errechnet und grafisch in einem Mittelwertplot vergleichend dargestellt.

Die Beurteilung der Calloseeinlagerung in den Samenanlagen erfolgte nach vier verschiedenen Gesichtspunkten (Tab. 5).

Tab. 5. Boniturschema für die Callosebonitur in den Samenanlagen

BONITUR - PUNKT	MERKMAL
0	Keine Calloseeinlagerungen in der Samenanlage
1	Beginnende Einlagerung von Callose-wenig Callose vorhanden
2	Samenanlage zu 2/3 mit Callose gefüllt
3	Samenanlage vollständig mit Callose gefüllt - sehr intensiv

Auf Grundlage der Vergabe der Bonitурpunkte wurden Rangzahlen festgelegt und anschließend ein Mann-Whitney-Rangsummentest durchgeführt. Zur Darstellung der Intensität der Calloseeinlagerung in den Samenanlagen zu verschiedenen Zeiträumen der Samenanlagenentwicklung wurde schließlich der Quotient der Rangsummen und der Anzahl der untersuchten Plazenten je Genotyp ermittelt und in einem Linienplot grafisch dargestellt.

Zur Ermittlung der Beziehung zwischen Embryosackheterogenität und Stärke der Calloseeinlagerung sowie Abweichen aus Callosebonitur in den Samenanlagen wurden Regressionsanalysen durchgeführt.

Die statistischen Berechnungen bezüglich der Calciumeinlagerung in den Samenanlagen basierten zunächst auf der computerunterstützten Feststellung der Anzahl und Dichte der Calciumcluster mit dem CellExplorer2001. Anschließend wurde eine ANOVA (Analysis of Variance) mit Newman-Keuls-Test durchgeführt. Die statistische Auswertung der Untersuchungen zur Pollenvitalität, Embryosackflächenvergrößerung nach induzierter Bestäubung, Samenentwicklung, Samengewicht, biochemischen und mikroskopischen Inhaltsstoffanalyse im Endosperm reifer Samen, sowie der Keimfähigkeit und Triebkraft der Samen erfolgte mittels ANOVA und MANOVA mit anschließenden Newman-Keuls-Test.

Für die Feststellung der positionsabhängigen Unterschiede der Samenanlagen an der Plazenta bezüglich der Embryosackheterogenität und Embryosackflächenvergrößerung nach induzierter Bestäubung und bezüglich des Pollenschlauchwachstums wurde ebenfalls eine ANOVA mit Newman-Keuls-Test durchgeführt. Unterschiede in den Samenparametern Keimfähigkeit, Triebkraft, Samengewicht, Kohlenhydrat- und Proteingehalt, sowie Samenentwicklung, die auf der unterschiedlichen Samenposition in der Kapsel basierten, wurden ebenfalls mit ANOVA und MANOVA und dem Newman-Keuls-Test statistisch erfasst. Damit wurden auch Veränderungen im Samengewicht, Kohlenhydrat- und Proteingehalt mit zunehmendem Kapselalter errechnet.

Die mikroskopischen Untersuchungen der Proteine und Lipide im Endosperm erfolgte nach der planimetrischen Methode. Dabei wurde innerhalb der digitalen mikroskopischen Aufnahme ein Feld mit einer festgelegten Größe von (7,9 x 6,7 cm) bei einem 10er Objektiv definiert. Innerhalb dieses Feldes wurden jeweils mittels des Bildbearbeitungsprogramms CellExplorer2001 die Partikel detektiert und somit die Dichte der festgestellten Partikel in diesem Feld errechnet. Ebenfalls wurde zur Überprüfung, ob die festgestellten Unterschiede signifikant waren, eine ANOVA mit anschließenden Newman-Keuls-Test durchgeführt.

Für die Feststellung der Beziehung zwischen Samenanlagenqualität und Saatgutqualität wurde sowohl eine Regressionsanalyse, als auch eine Berechnung der Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Diese Rangkorrelationsberechnung nach Spearman fand auch in der Feststellung der Korrelationen zwischen den untersuchten Samenparametern und der Keimfähigkeit und Triebkraft Anwendung (Köhler et al. 1996).

3 Ergebnisse

3.1. Samenanlagenmerkmale

3.1.1. Anatomisch-morphologische Untersuchungen zu Aufbau und Struktur der Samenanlagen

Zunächst wurden allgemeine Untersuchungen an unbefruchteten sowie befruchteten Samenanlagen durchgeführt, um generelle Aussagen über Aufbau und Struktur treffen zu können.

3.1.1. 1. Grundlegende Untersuchungen

Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand die Detektion des Samenanlagentypus der *Cyclamen* und das Erkennen anatomischer Besonderheiten. Des Weiteren sollten mögliche Asymmetrien im Bau der Samenanlagen festgestellt werden.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Samenanlagen

Mithilfe der REM-Untersuchungen war es möglich, die Oberflächenstruktur der Samenanlagen zu analysieren. Auffallend war, dass die Mikropyle von einem mikropylaren Obturator umgeben ist (Abb. 6B, C). Die Mikropyle befindet sich auf der Oberseite der Samenanlage und ist in apikaler Richtung zur Griffelbasis hin gerichtet. Bei der vergleichenden Betrachtung verschiedener Samenanlagen fiel auf, dass einige Samenanlagen in sich verdreht an der Plazenta inseriert sind. Bei ihnen befand sich die Mikropyle seitlich, also nicht auf der Oberseite der Samenanlage. Ausgehend von der Position der Mikropyle wurde der Typ der Samenanlage als hemianatrop klassifiziert. Weiterhin konnten bei diesen ersten grundlegenden Untersuchungen zur Struktur der Samenanlagen festgestellt werden, dass sich die rings um die Plazenta befindlichen Samenanlagen hinsichtlich ihrer Größe und Form unterschieden (Abb. 6A). Damit ergaben sich erste Anzeichen für eine Heterogenität im Bau der Samenanlagen innerhalb einer Plazenta. Daneben gelang es erste Einblicke in das Innere der Samenanlage, den Embryosack, vorzunehmen (Abb. 6D). Inkrustierungen an den Zellwänden des Nucellus waren nicht zu sehen. Es ist daher nicht zu vermuten, dass es Störungen der Versorgung innerhalb der Samenanlage gab, wenn man davon ausgeht, dass der Transport der Metabolite innerhalb der Samenanlage über apo- bzw. symplastischen Weg erfolgt.

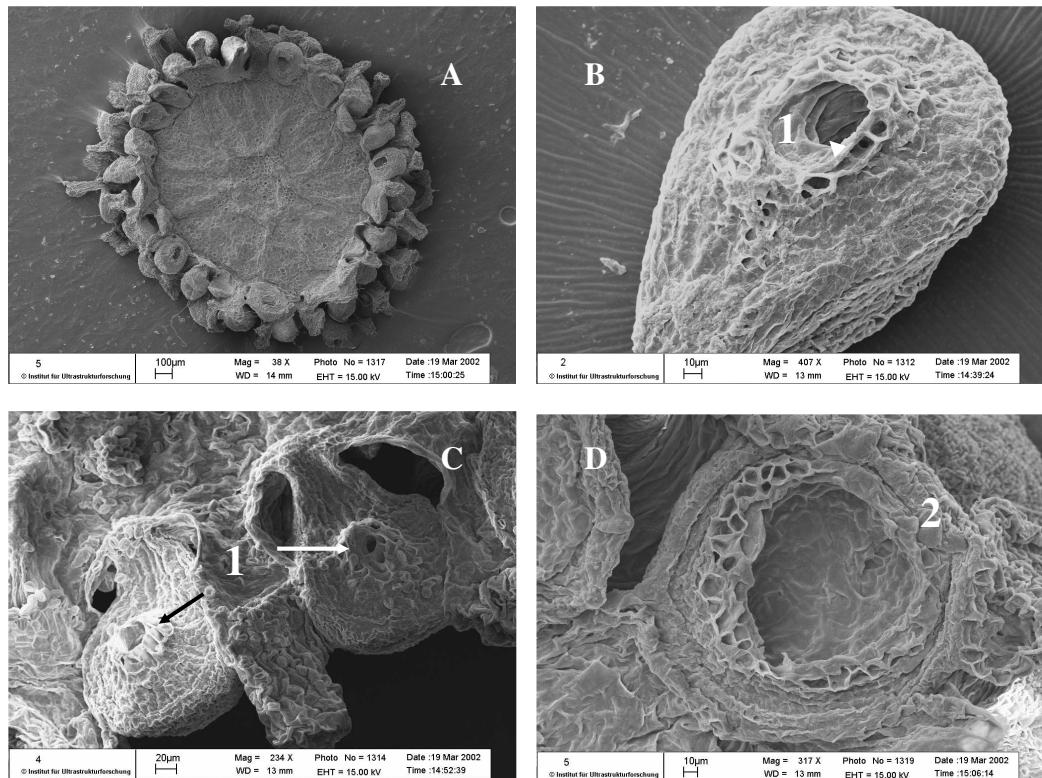


Abb. 6. REM-Aufnahmen der Plazenta und der Samenanlagen. A) Plazentaquerschnitt mit radiär angeordneten Samenanlagen, B), C) Samenanlagen mit Mikropyle (1), D) Samenanlagenquerschnitt mit Embryosack (2).

Feinstrukturanalyse unbefruchteter Samenanlagen

Bei den Untersuchungen mittels Durchlichtmikroskop wurden zwei verschiedene Methoden erfolgreich eingesetzt. Zum einen gelang es mit der Clearingtechnik Feinstrukturen, zu detektieren. Somit konnte ausgehend von der Mikropyle und im Embryosack endend der Pollenschlauchkanal bestimmt werden (Abb. 9B). Nachgewiesen wurde ebenfalls der bitegmische Aufbau der Samenanlagen (Abb. 7, 8A). Untersuchungen an sich entwickelnden Samenanlagen zeigten außerdem den tenuinucellaten Aufbau der Samenanlagen (Abb. 7).

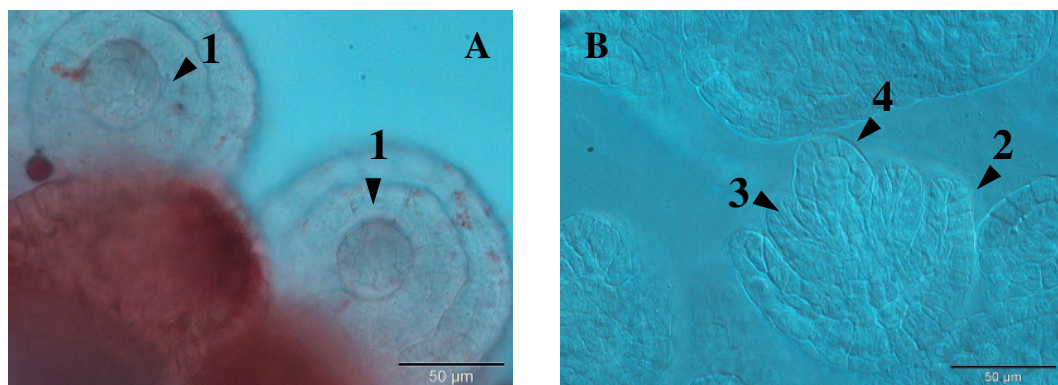


Abb. 7. Zustand der Samenanlagen ca. 8 Tage vor Anthesebeginn durch Clearing Technik aufgeklärt. A = Draufsicht, B = Seitenansicht, (1) Mikropyle, (2) äußeres Integument, (3) inneres Integument, (4) Nucellus.

Der hemianatrophe Charakter der Samenanlage konnte durch die halbmondförmige Ausbildung des Nucellus bestätigt werden (Abb. 8A). Die Mikropyle und der Nucellus befinden sich in einem Winkel von etwa 90° zum Funikulus. Die Zellen der zwei Integumente sind auffallend symmetrisch ausgebildet. Es war es möglich, Deformationen und Beschädigungen an den Integumenten zu erkennen (Abb. 8). Im Ergebnis ist daher festzuhalten, dass in methodischer Hinsicht die Clearingtechnik nach Herr geeignet ist, Untersuchungen bezüglich der Beschaffenheit der Integumente durchzuführen und deformierte Samenanlagen (Abb. 8B) von intakten Samenanlagen zu unterscheiden (Abb. 8A). Dies leistete einen Beitrag zur Einschätzung der Samenanlagenqualität unter Zugrundelegung der genannten Parameter. Allerdings war es nicht möglich die Samenanlagen derart transluzent zu machen, dass Inhalte im Embryosack sichtbar wurden. Daher wurden für die anschließenden Untersuchungen der generativen Einheiten der Samenanlagen ausschließlich Dünnschnittpräparate verwendet und entsprechend gefärbt.

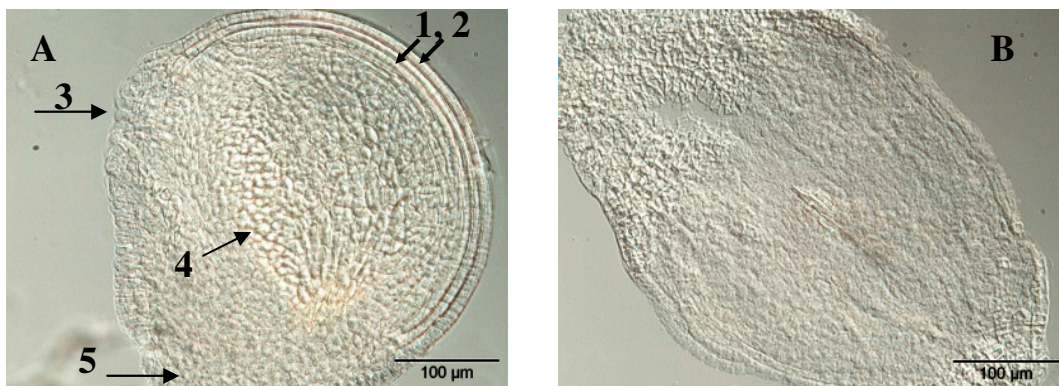


Abb. 8. Darstellung der Integumente der Samenanlagen. A) Samenanlage mit intakten Integumenten, (1) = inneres Integument, (2) = äußeres Integument, (3) = Mikropyle, (4) = Nucellus, (5) = Funikulus, B) deformierte Samenanlage mit degenerierten Integumenten (Unterscheidung nach innerem und äußerem Integument nicht mehr möglich). Darstellung nach Clearingbehandlung.

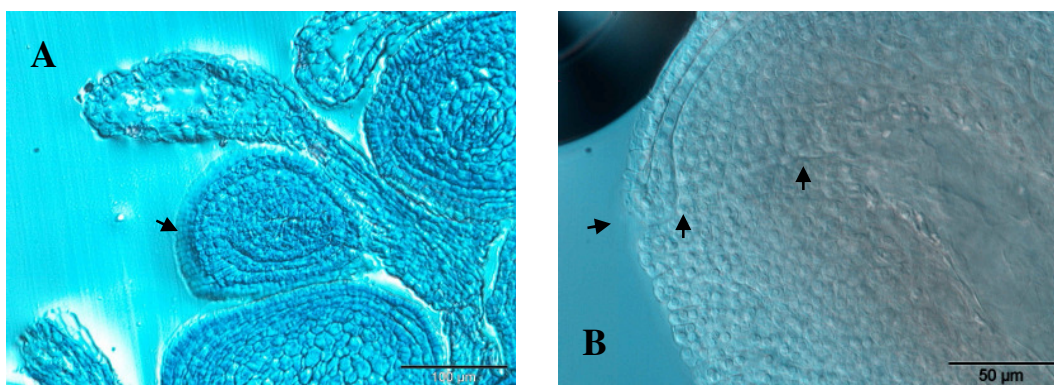


Abb. 9. A) degenerierte Samenanlage, B) Mikropylen- bzw. Pollenschlauchkanal, Clearing Technik, jeweils durch Pfeile gekennzeichnet.

Infolge der spezifischen Färbung der Zellkerne in den Dünnschnittpräparaten war es möglich, den Embryosack sichtbar zu machen (Abb. 10). Dieser entspricht dem Polygonumtyp und ist durch die charakteristische Verteilung der acht Kerne gekennzeichnet, die nach der Meiose der Megasporenmutterzelle und den darauf folgenden mitotischen Teilungen entstanden sind.

Drei der acht Kerne befinden sich am Mikropylarpol der Samenanlage und umgeben sich dort mit Zellwänden. Sie bilden zusammen den Eiapparat. Nur einer der drei Kerne bildet die Eizelle, die anderen die Synergiden. Weitere drei der acht Kerne befinden sich am Chalazapol der Samenanlage und bilden unter Zellwandbildung die Antipoden. Die übrigen Kerne, die Polkerne, befinden sich im Zentrum des Embryosacks und verschmelzen zum diploiden Embryosackkern. Während der Eiapparat und der diploide Embryosackkern zu Anthesebeginn der Blüte noch erkannt werden konnten, waren die Antipoden nicht mehr wahrnehmbar. Sie waren lediglich 1-2 Tage vor Anthesebeginn noch schwach sichtbar.

Es fiel auf, dass die Lage des Eiapparats durchaus nicht einheitlich war. In den meisten Fällen befand er sich an dem Pol, der der Chalaza gegenüberliegt. Gelegentlich lag der Eiapparat mittig oder auch am Chalazapol des Embryosacks.

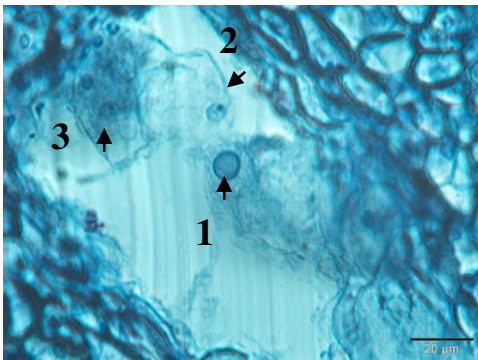


Abb. 10. Embryosack mit diploiden Embryosackkern (1), Eizelle (2) und Synergiden (3) am Mikropylarpol. Färbung mit Mayer's-Hämalaunlösung.

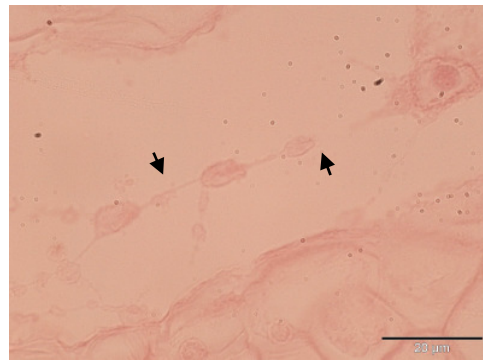


Abb. 11. Plasmafäden im Embryosack, durch Pfeile gekennzeichnet.

Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung zeigte sich, dass der gesamte Eiapparat in einem Zeitraum von 3 bis 5 Tagen nach Anthesebeginn in Richtung Chalazapol wanderte und dort fest verankert wurde. Dieser Vorgang wurde durch das Vorhandensein von fädigen Plasmastrukturen, welche den Embryosack in ganzer Länge durchziehen, ermöglicht (Abb. 11). Bei der vergleichenden Betrachtung der Formen der Samenanlagen fiel auf, dass diese durchaus nicht einheitlich waren. Auflichtmikroskopisch konnten drei unterschiedliche Formen von Samenanlagen klassifiziert werden. So besitzen manche Samenanlagen eine länglich ovale Form, andere dagegen sind rundlich oval, wiederum andere sind von länglich schmaler Form. Ein Zusammenhang zwischen Form und Position der Samenanlagen an der Plazenta war nicht ersichtlich.

Untersuchungen zur Leitbündelanordnung und zur Versorgungssituation in den Samenanlagen

Erste Untersuchungen zur Leitbündelanordnung in der Plazenta ergaben, dass in den meisten Fällen sieben Leitbündelstränge vom Blütenstiel direkt in die Plazenta übergangen und sich dort regelmäßig seitlich verzweigten.

Diese Anordnung war in allen Bereichen der Plazenta feststellbar (Abb. 12). In der Samenanlage selbst übernahm das Funikularleitbündel die weitere Versorgung. Es durchzog den Funikulus und teilte sich im chalazalen Bereich in zwei Hauptstränge auf, die die Samenanlage seitlich durchzogen. Der Transport der Nährstoffe in die Samenanlage erfolgte demnach über die Leitbündel.

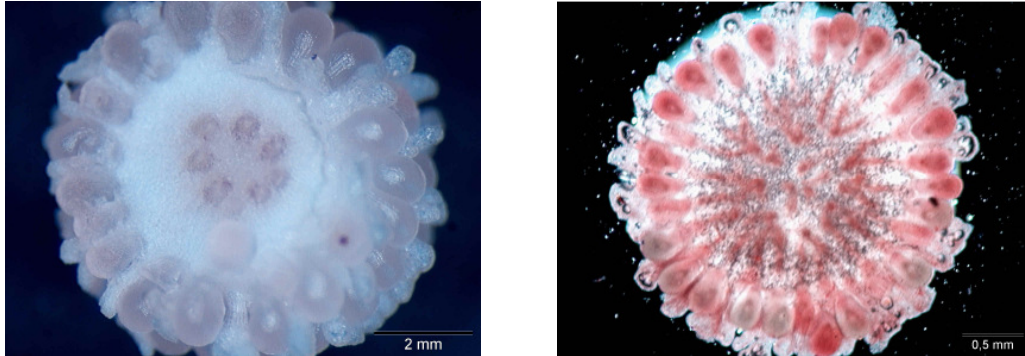


Abb. 12. Darstellung der Leitbündel in der Plazenta. Links: 7 Leitbündel in der Mitte der Plazenta. Rechts: Safraninfärbung der zu den Samenanlagen verlaufenden Leitbündel.

3.1.1. 2. Spezielle anatomisch-morphologische Untersuchungen zur Beschaffenheit der Embryosäcke

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass zu Anthesebeginn eine große Heterogenität bezüglich Größe und Form der Embryosäcke innerhalb der Samenanlagen einer Plazenta bestand (Abb. 13). Diese Unterschiede waren aber auch zwischen verschiedenen Blüten einer Pflanze sowie zwischen verschiedenen Einzelpflanzen eines Genotyps zu erkennen. Die vergleichenden Untersuchungen der einzelnen Embryosäcke basierten auf der Ermittlung der Embryosackfläche (Abb. 14).



Abb. 13. Unterschiedliche Größen der Embryosäcke (Pfeile), Darstellung der Embryosackheterogenität nach Anilinblaufärbung und Dunkelfeldmikroskopie.

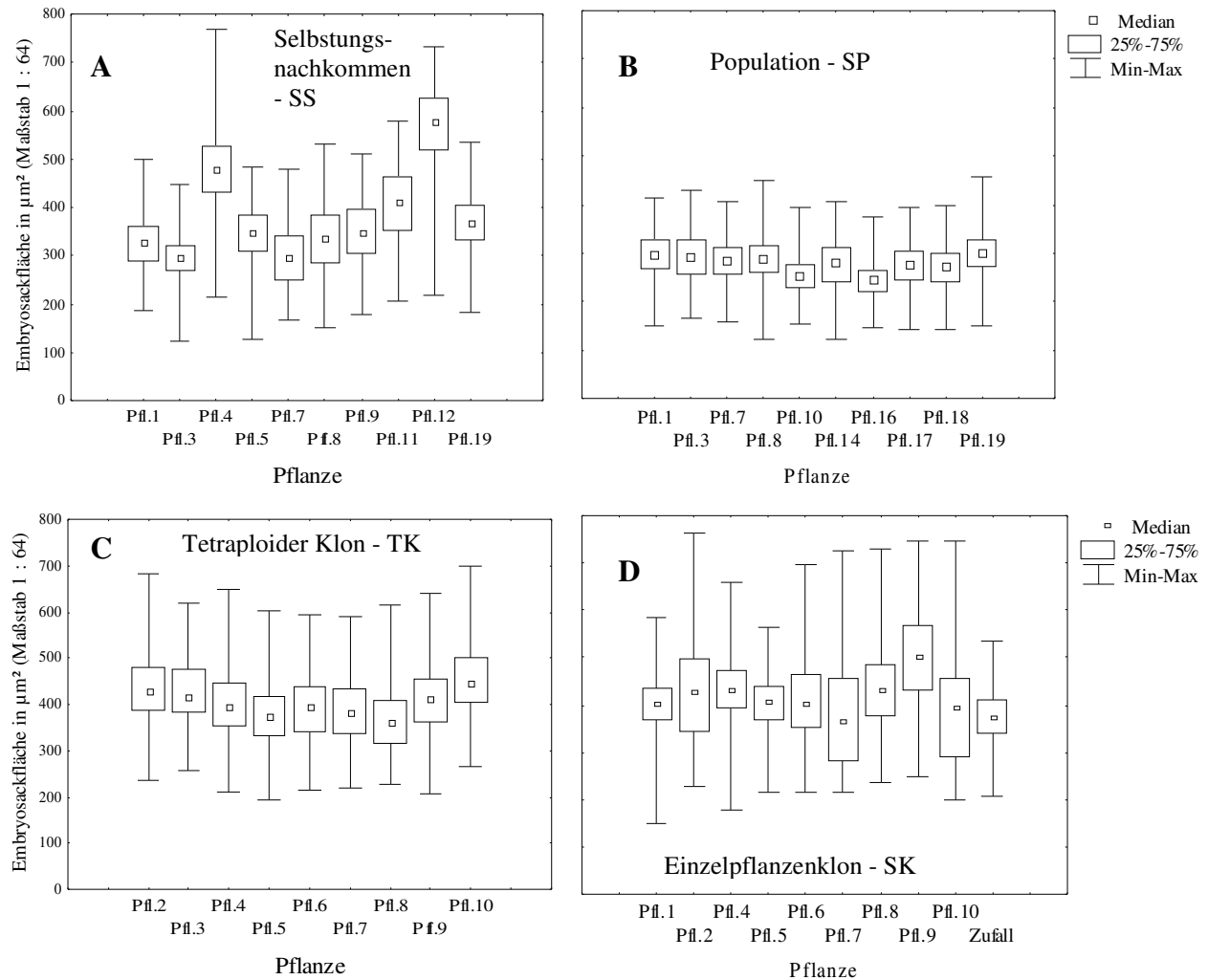


Abb. 14. Zusammenfassung der Embryosackflächen der Genotypen. A) SS, (n = 10 Pflanzen mit je 5 Blüten = 5000 Samenanlagen), B) SP, (n = 10 Pflanzen mit je 5 Blüten = 5000 Samenanlagen), C) TK (n = 9 Pflanzen mit je 5 Blüten = 4500 Samenanlagen), D) SK, (n = 10 Pflanzen mit je 5 Blüten = 5000 Samenanlagen). Für die statistische Auswertung der Heterogenität der Embryosack - Flächen wurden die Mediane, die Interquartilbereiche (75 % - 25 %) sowie die Variationsbreite $x_{\max} - x_{\min}$ ermittelt und in Box-Whisker-Plots grafisch dargestellt. Die Variationsbreite repräsentiert hierbei 100 % aller Messwerte und der Interquartilbereich gibt 50 % der Messwerte an. Maßstab 1:64 bedeutet, $1 \mu\text{m}^2 = 64 \mu\text{m}^2 = \text{Fläche} \times 64$.

Es zeigte sich, dass der Genotyp SK die größte Variabilität im Vergleich der untersuchten Einzelpflanzen besaß (Abb. 14D).

Die Gesamtwerte der Einzelpflanzen hatten eine große Streuung. Ebenso die Werte, welche 50 % der Messwerte repräsentieren. Diese Streuung konnte zuvor auch innerhalb einer Plazenta nachgewiesen werden. Bei SS zeigte sich ebenfalls eine breite Streuung der Messwerte. Allerdings war sie hier geringer als bei SK (Abb. 14A). SP dagegen hatte die geringste Streuung (Abb. 14B). Die Werte waren im Wesentlichen durch ihre relative Homogenität gekennzeichnet. Schließlich war auch TK bezüglich der Werte als relativ homogen anzusehen (Abb. 14C). Es konnten Unterschiede bezüglich der Embryosackflächen zwischen verschiedenen Plazenten einer Einzelpflanze und zwischen verschiedenen Einzelpflanzen eines Genotyps erkannt werden. Darüber hinaus unterschieden sich auch die untersuchten Genotypen hinsichtlich der Streuung der Werte untereinander erheblich.

Für den Vergleich der Genotypen untereinander wurden die Variationskoeffizienten (cv in %) aller Blüten errechnet. Anschließend wurden die Mittelwerte der Variationskoeffizienten aller Genotypen ermittelt und in einem Mittelwertplot grafisch dargestellt (Abb. 15).

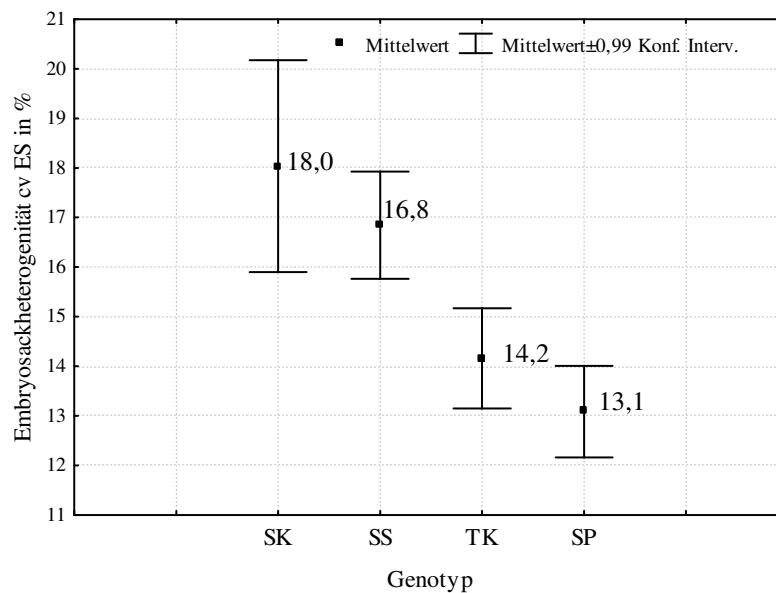


Abb. 15. Vergleichende Darstellung der Variationskoeffizienten cv in % aller Genotypen bezüglich der Heterogenität der Embryosackflächen. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$).

Die Verteilung der einzelnen Embryosackflächenwerte wurde im Anschluss an die Ermittlung der jeweiligen Variationsbreite für jeden Genotyp in Histogrammen ermittelt. Somit konnte ein Normalbereich für die Embryosackflächen jedes Genotyps definiert werden (Tab. 6). Auf dieser Grundlage wurde ermittelt, wie viel Prozent der untersuchten Samenanlagen bzw. Embryosäcke normal verteilt waren und wie viele vom Normalbereich abwichen.

Tab. 6. Vergleichende Darstellung der Embryosackflächen aller Genotypen und Normalverteilung der Samenanlagen bezüglich der Größe der Embryosackflächen. SA = Samenanlagen, (n) SA gesamt = Untersuchungsumfang, Maßstab 1:64 bedeutet, $1 \mu\text{m}^2 = 64 \mu\text{m}^2 = \text{Fläche} \times 64$.

Genotyp	Normalbereich (Fläche μm^2 , 1:64)	(n) SA im Normalbereich	%	(n) SA außerhalb Normalbereich	%	(n) SA gesamt
SP	246,2 - 346,2	5608	68	2672	32	8280
SK	361,9 - 461,9	3045	46	3514	54	6559
SS	287,0 - 387,0	2918	45	2208	55	6536
TK	376,2 - 476,2	2422	47	2694	53	5116

Es wurde deutlich, dass SP prozentual mit 68 % die meisten Embryosäcke hatte, die bezüglich ihrer Flächenwerte normal verteilt waren. Der Vergleich der einzelnen Genotypen offenbarte auch Unterschiede in der Größe der Embryosäcke zwischen den diploiden Genotypen.

Während SK die größten Embryosäcke besaß, hatte SP die Kleinsten. Die Werte von SS lagen dazwischen (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.1.2. Physiologische Untersuchungen an den Samenanlagen

Neben den allgemeinen und speziellen Untersuchungen zur Beschaffenheit der Samenanlagen und Embryosäcke an der Plazenta wurden auch physiologische Untersuchungen an bestäubten und unbestäubten Samenanlagen durchgeführt, um zu klären, welche grundlegenden physiologischen Prozesse vor und nach einer induzierten Befruchtung in den Samenanlagen ablaufen.

3.1.2. 1. Physiologische Untersuchungen an unbefruchteten Samenanlagen

Ein Phänomen, das in den unbefruchteten Samenanlagen von *C. persicum* beobachtet werden konnte, war das zeitlich begrenzte Auftreten von Calloseeinlagerungen an den Zellwänden des Nucellus (Abb. 16).

Verlauf der Calloseeinlagerung im Bereich des Embryosacks

Besonders viel Callose wurde zum Zeitpunkt des Anthesebeginns eingelagert. Es fiel auf, dass zu verschiedenen Zeitpunkten der Blütenentwicklung die Intensität der Einlagerung zu- bzw. abnahm (Abb. 17, 18).

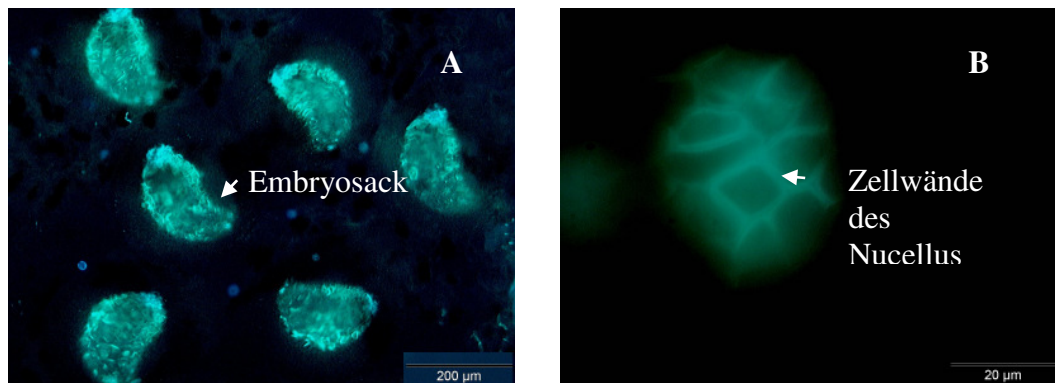


Abb. 16. Calloseeinlagerung im Bereich des Embryosacks (A), in den Zellwänden (B) des Nucellus.

Die Calloseeinlagerung begann ab einem Zeitpunkt von 3 Tagen vor Anthesebeginn. Hier zeigte sich vor allem im Bereich der Chalaza eine hohe Konzentration von Callose (Abb. 18). Im übrigen Bereich des Embryosacks war dagegen nur eine schwache Callosekonzentration zu erkennen, sodass der Embryosack nach UV-Anregung sich zwar deutlich von der übrigen Samenanlage unterscheiden ließ,

aber im Zellwandbereich keine größeren Ablagerungen von Callose zu sehen waren. Zu Anthesebeginn erhöhte sich die Konzentration der Callose im Bereich des Embryosacks stark. Ab diesem Zeitpunkt waren alle Zellwände des Embryosacks mit Calloseablagerungen behaftet (Abb. 18). Bei der Untersuchung der Calloseeinlagerung 3 bis 5 Tage nach Anthesebeginn (3-5 TnA) fiel auf, dass die Einlagerung allmählich zurückging. Zum einen ließ die Intensität der Fluoreszenz nach, zum anderen konnten nun deutliche Bereiche im Embryosack erkannt werden, welche frei von Calloseeinlagerungen waren. Dies zeigte sich noch deutlicher 10 Tage nach Anthesebeginn (10 TnA). Hier war die Calloseeinlagerung im Bereich der Embryosäcke fast vollständig zurückgegangen. Es zeigte sich lediglich noch eine schwache Fluoreszenz, sodass der Embryosack nur noch undeutlich von der übrigen Samenanlage zu unterscheiden war. Es wurde deutlich, dass der zeitliche Verlauf der Calloseeinlagerung zwischen den untersuchten Genotypen grundsätzlich verschieden war (Abb.17). Die Calloseeinlagerung bei SS und bei TK begann bereits 3 Tage vor Anthesebeginn (3 TvA). Bei SP und SK war zu diesem Zeitpunkt noch keine deutliche Einlagerung von Callose zu erkennen. Dies geschah bei diesen beiden Genotypen erst zu Anthesebeginn (AB).

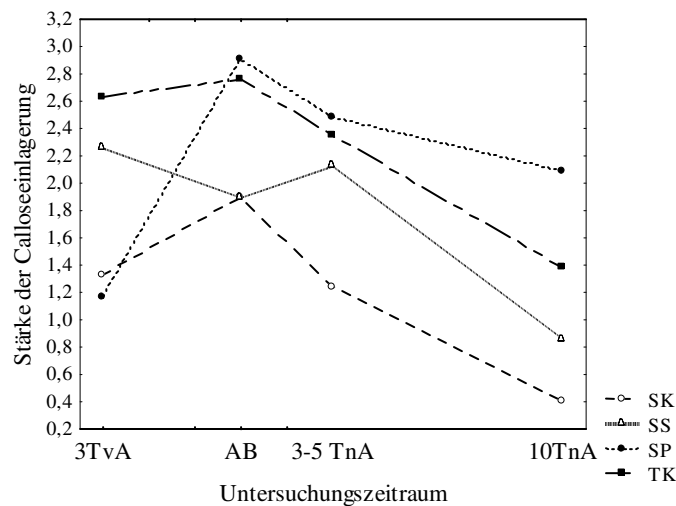


Abb. 17. Vergleichende Darstellung der Stärke der Calloseeinlagerung aller Genotypen zu verschiedenen Zeiten der Blütenentwicklung nach Callosebonitur ↑ Tab. 5. Varianzanalyse multifaktoriell, $\alpha=0,05$, 3TvA = 3 Tage vor Anthesebeginn, AB = Anthesebeginn, 3-5 TnA = 3-5 Tage nach Anthesebeginn, 10 TnA = 10 Tage nach Anthesebeginn, $n_{SS, SK, SP} = 120$ Blüten = 12000 Samenanlagen, $n_{TK} = 86$ Blüten = 8600 Samenanlagen.

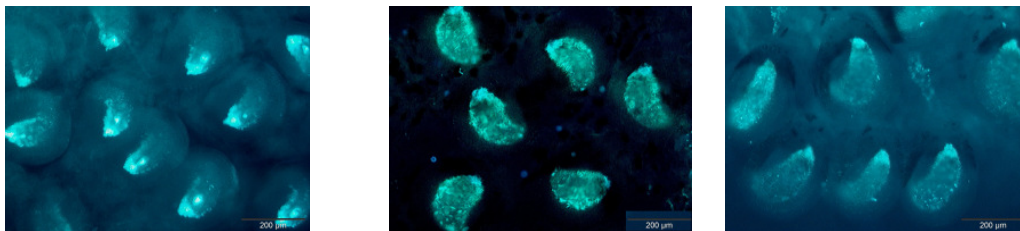


Abb. 18. Calloseeinlagerung im Bereich des Embryosacks zu verschiedenen Zeiten der Blütenentwicklung. Links: 3 Tage vor Anthesebeginn, Mitte: Anthesebeginn, rechts: 5 Tage nach Anthesebeginn. Demonstriert am Beispiel Genotyp SP.

3 Tage vor Anthesebeginn					Anthesebeginn				
	KB	PB	SB	TB	K	P	S	T	
TB	s**	s**	n.s.	2,63	1,89	s**	n.s.	s**	K
SB	s**	s**	2,28			2,9	s**	s*	P
PB	n.s.	1,13					1,93	n.s.	S
KB	1,31							2,88	T
KA	1,24							0,41	KC
PA	s**	2,45					2,09	s**	PC
SA	s**	n.s.	2,14			0,86	s**	n.s.	SC
TA	s**	n.s.	n.s.	2,38	1,38	n.s.	n.s.	s**	TC
	KA	PA	SA	TA	TC	SC	PC	KC	
3-5 Tage nach Anthesebeginn					10 Tage nach Anthesebeginn				

Tab. 7. Signifikanztabelle bezüglich der Stärke der Calloseeinlagerung der einzelnen Genotypen zu verschiedenen Zeiten der Blütenentwicklung untereinander. Bezeichnung: erster Buchstabe = Genotyp S = SS, K = SK, P = SP, T = TK, zweiter Buchstabe: Untersuchungszeitpunkt: A = 3 Tage vor Anthesebeginn, ohne = Anthesebeginn, B = 3 bis 5 Tage nach Anthesebeginn, C = 10 Tage nach Anthesebeginn, s** - sign. ($p \leq 0,01$), s* - sign ($p \leq 0,05$), n.s. - nicht signifikant. Die Zahlen geben die Stärke der Calloseeinlagerung zum jeweiligen Zeitpunkt an. Je höher der Wert, umso stärker die Calloseeinlagerung. Mann-Whitney-Rangsummentest.

SK					SP				
	KB	K	KA	KC	PB	P	PA	PC	
KC	s**	s**	s**	0,41	1,13	s**	s**	s**	PB
KA	n.s.	s*	1,24			2,90	s**	s**	P
K	s**	1,89					2,45	s*	PA
KB	1,31							2,09	PC
SB	2,28							2,63	TB
S	n.s.	1,93					2,88	n.s.	T
SA	n.s.	n.s.	2,14			2,38	s*	n.s.	TA
SC	s**	s**	s**	0,86	1,38	s**	s**	s**	TC
	SB	S	SA	SC	TC	TA	T	TB	
SS					TK				

Tab. 8. Signifikanztabelle bezüglich der Stärke der Calloseeinlagerung der einzelnen Genotypen zu verschiedenen Zeiten der Blütenentwicklung. Bezeichnung: erster Buchstabe = Genotyp S = SS, K = SK, P = SP, T = TK, zweiter Buchstabe: Untersuchungszeitpunkt: A = 3 Tage vor Anthesebeginn, ohne = Anthesebeginn, B = 3 bis 5 Tage nach Anthesebeginn, C = 10 Tage nach Anthesebeginn, s** - sign. ($p \leq 0,01$), s* - sign ($p \leq 0,05$), n.s. - nicht signifikant. Die Zahlen geben die Stärke der Calloseeinlagerung zum jeweiligen Zeitpunkt an. Je höher der Wert, umso stärker die Calloseeinlagerung. Mann-Whitney-Rangsummentest.

Mit Hilfe eines Mann-Whitney-Rangsummentest konnten zwischen den Genotypen in den verschiedenen Stadien der Blütenentwicklung zum Teil signifikante Unterschiede bezüglich der Stärke der Calloseeinlagerung festgestellt werden. Das Maximum der Calloseeinlagerung wurde bei allen untersuchten Genotypen zu Anthesebeginn erreicht. Lediglich bei SS liegt der Wert zu Anthesebeginn unter den Werten, 3 Tage vor bzw. 3-5 Tage nach Anthesebeginn. Diese Schwankung war jedoch nicht signifikant. Im Vergleich der Genotypen zu Anthesebeginn untereinander zeigte sich, dass in den Embryosäcken von SP, signifikant mehr Callose eingelagert wurde als bei den übrigen Genotypen. Auch bezüglich des Rückganges der Calloseeinlagerung ließen sich signifikante Unterschiede erkennen. Die Stärke der Calloseeinlagerung war bereits 3-5 Tage nach Anthesebeginn bei den Genotypen SK, SP und TK signifikant geringer als zu Anthesebeginn. Lediglich bei SS zeigte sich zu diesem Zeitpunkt noch kein deutlicher Rückgang der Einlagerung. Hier war das Niveau hoch und konstant. 10 Tage nach Anthesebeginn konnte bei allen untersuchten Genotypen ein deutlicher Rückgang der Einlagerung festgestellt werden. Auch zu diesem Zeitpunkt hatte SP im Genotypenvergleich noch die meiste Callose innerhalb des Embryosacks eingelagert (Tab. 7, 8).

Aberrationen bei der Calloseeinlagerung

Bei der Bonitur der Calloseeinlagerung fiel bei allen Genotypen auf, dass viele Samenanlagen an einer Plazenta hinsichtlich der Stärke der Calloseeinlagerung homogen waren, andere dagegen nicht. Diese werden nachfolgend als Abweicher bezeichnet. Die Abweicher waren dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität der Fluoreszenz bei ihnen geringer bzw. auffallend stärker war. (Tab. 9). Auffallend war, dass SK in einem Zeitraum von 3 Tagen vor Anthesebeginn bis 3-5 Tagen nach Anthesebeginn mit 15% die meisten Abweicher hatte, und SP mit 2,2% sowie TK mit 1,8% die wenigsten. Somit konnten neben den zuvor erfassten strukturellen auch physiologische Unregelmäßigkeiten in unbefruchteten Samenanlagen festgestellt werden.

Tab. 9. Darstellung der Abweicher aus der Callosebonitur zu verschiedenen Zeitpunkten. 3TvA = 3 Tage vor Anthesebeginn, AB = Anthesebeginn, 3-5TnA = 3 bis 5 Tage nach Anthesebeginn, 10TnA = 10 Tage nach Anthesebeginn.

Genotyp	Untersuchungszeitraum											
	3 TvA			AB			3-5 TnA			10TnA		
	gesamt	Abweicher	%	gesamt	Abweicher	%	gesamt	Abweicher	%	gesamt	Abweicher	%
	Σ	Abs.	Rel.	Σ	Abs.	Rel.	Σ	Abs.	Rel.	Σ	Abs.	Rel.
SK	1501	102	6,8	1929	57	2,95	1399	210	15,01	1953	52	2,66
SS	2340	22	0,9	2246	40	1,78	2135	141	6,6	1915	155	8,09
SP	2778	26	0,9	4453	58	1,3	3348	75	2,24	2955	43	1,46
TK	2496	18	0,7	2496	10	0,4	1548	29	1,87	373	10	2,68

Korrelationen zwischen strukturellen und physiologischen Abnormitäten

Zwischen den Werten der Embryosackheterogenität und den Gesamtmittelwerten der Abweicher aus der Callosebonitur konnte ein Zusammenhang abgeleitet werden. Beide Faktoren korrelierten positiv miteinander (Tab. 20). Die Korrelation ist hoch signifikant für $p \leq 0,01$ (Abb. 19).

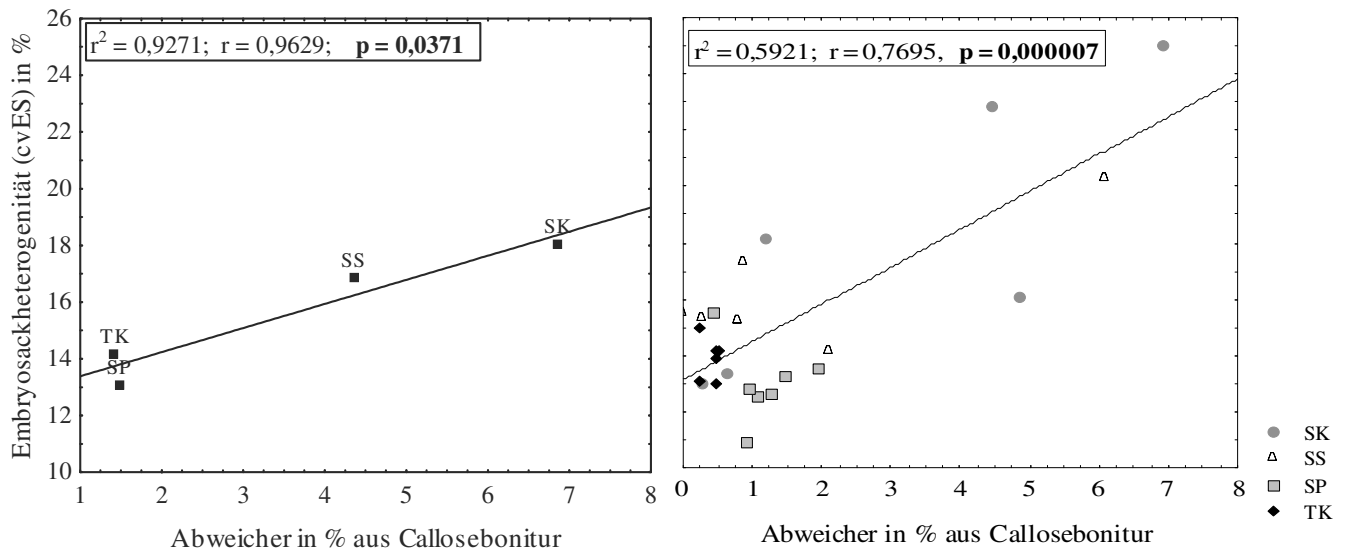


Abb. 19. Korrelation zwischen Embryosackheterogenität und Abweichern aus Callosebonitur. Regressionsanalyse. A) Genotypenvergleich, B) Einzelpflanzenvergleich innerhalb der Genotypen.

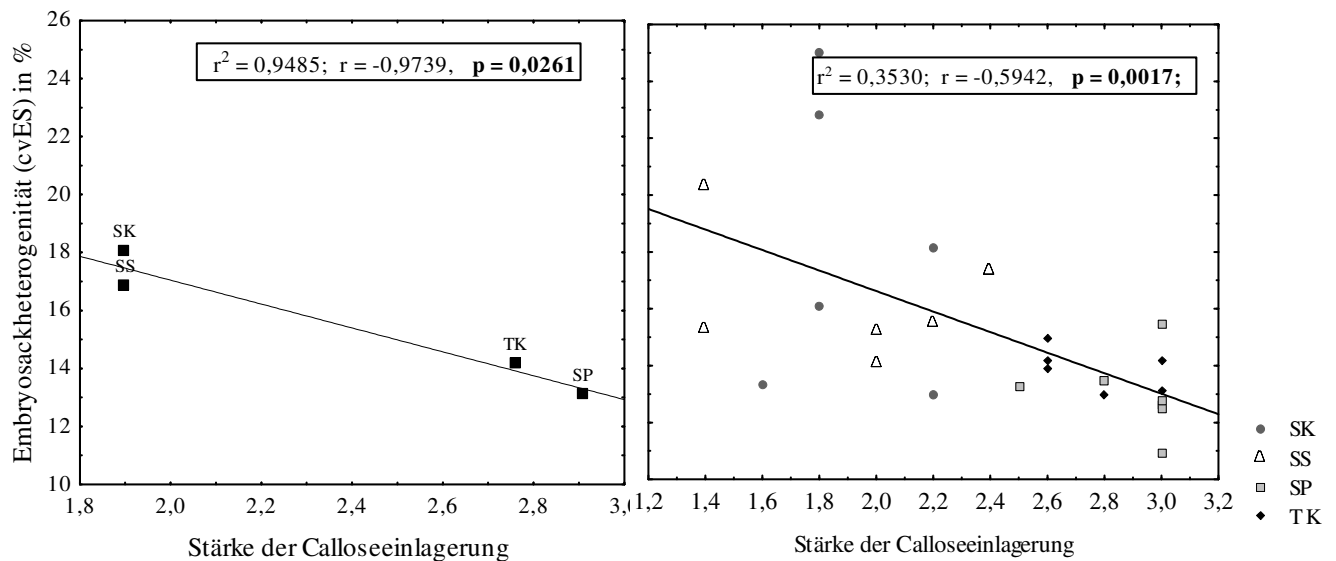


Abb. 20. Korrelation zwischen Embryosackheterogenität und Stärke der Calloseeinlagerung zu Anthesebeginn. Regressionsanalyse. A) Genotypenvergleich, B) Einzelpflanzenvergleich innerhalb der Genotypen.

Die Unterschiede, die zwischen den untersuchten Pflanzen festgestellt wurden, waren auch im direkten Vergleich der Genotypen feststellbar (Abb. 19A). Außerdem gab es einen Zusammenhang zwischen der Heterogenität der Embryosäcke und der Stärke der Calloseeinlagerung (Abb. 20, Tab. 20). Die beiden Faktoren korrelierten negativ miteinander. Es fiel auf, dass eine hohe Embryosackheterogenität mit einer schwachen Calloseeinlagerung in den Embryosäcken korrelierte.

Die Homogenität der Embryosackflächen korrelierte dagegen positiv mit einer starken Einlagerung von Callose. Diese Beziehung, die zwischen Einzelpflanzen nachweisbar war, konnte auch zwischen den untersuchten Genotypen erkannt werden (Abb. 20A). Die Genotypen SK sowie SS besaßen im Vergleich zu den Genotypen SP und TK einen höheren Variationskoeffizienten im Hinblick auf die Embryosackheterogenität. Auch hinsichtlich der Calloseeinlagerung zu Anthesebeginn wurde deutlich, dass die Genotypen SK und SS die schwächsten Werte aufweisen. Die Genotypen SP und TK lagerten dagegen deutlich mehr Callose ein.

Auswirkungen der Calloseeinlagerung auf Pollenschlauchwachstum und Samenansatz

Es war nicht bekannt, ob die Einlagerung von Callose in den Embryosäcken der Samenanlagen einen nachweisbar negativen Effekt auf das Pollenschlauchwachstum bzw. die Befruchtung ausübte. Dazu wurden die Untersuchungen zur Calloseeinlagerung in den Samenanlagen an einigen Blüten, an denen wenige Tage vor Anthesebeginn eine Bestäubung induziert wurde, wiederholt. Es wurde wiederholt erkannt, dass das Einwachsen der Pollenschläuche in Samenanlagen mit Calloseeinlagerungen im Bereich des Embryosacks und der Mikropyle nicht beeinträchtigt oder gar gehemmt wurde. Die eingelagerte Callose im Bereich des Obturators bzw. der Mikropyle fungierte offenbar als eine Art Leitbahn für die Orientierung der Pollenschläuche (Abb. 21). Diesbezüglich wurde mehrfach beobachtet, dass exakt in diesem Bereich der Samenanlage der Pollenschlauch einwuchs. Dabei wuchs immer nur ein Pollenschlauch in eine Samenanlage ein.

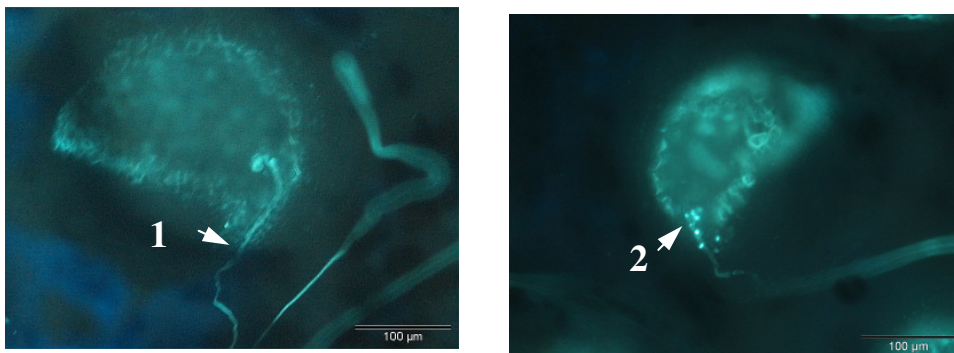


Abb. 21. Links: einwachsender Pollenschlauch in den Embryosack durch den Obturator (1) ca. 3 Tage nach Bestäubung, rechts: Callosepfropfen (2) im Bereich des Obturators ca. 2 Tage nach dem Einwachsen des Pollenschlauches.

Vor dem Einwachsen der Pollenschläuche in die Samenanlage änderten die Pollenschläuche, die bis dahin relativ geradlinig durchgewachsen waren, mehrfach die Richtung und machten ausgeprägte Loopings, bevor sie in die Samenanlage einwuchsen. An Blüten, bei denen nach induzierter Bestäubung nur vereinzelte Pollenschläuche die Plazenta erreichten und damit nur wenige Pollenschläuche für die Befruchtung der Samenanlagen zur Verfügung standen, konnte die Calloseeinlagerung im Bereich des Obturators in dieser Form nicht beobachtet werden. Hier waren lediglich nur vereinzelt Samenanlagen mit Callose behaftetem Obturator, zu erkennen.

Es wuchsen auch hier wiederum nur wenige Pollenschläuche ein. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde festgestellt, dass direkt nach dem Einwachsen der Pollenschläuche in die Samenanlagen der Abbau der Pollenschläuche begann, sodass bereits 2 Tage nach dem Einwachsen keine Pollenschlauchreste mehr erkannt werden konnten. Dennoch war innerhalb der Samenanlage deutlich zu erkennen, dass in sie ein Pollenschlauch eingewachsen war. Bereits 7 Tage nach Bestäubung der Blüte konnten innerhalb der Samenanlage deutlich 4 bis 6 Callosepfropfen erkannt werden (Abb. 21). Die Pfropfen befanden sich ausschließlich im Bereich der Eizelle und der Synergiden. Beim vorsichtigen Fokussieren mit dem Mikroskop war es vereinzelt noch möglich, Fragmente des eingewachsenen Pollenschlauches zu beobachten. Des Weiteren wurde bei allen Genotypen nach Bestäubungen im Bestand Samenanlagen nachgewiesen.

3.1.2. 2. Physiologische Untersuchungen an befruchteten Samenanlagen

Nach induzierter Bestäubung der Blüten zu Anthesebeginn kam es bei allen Genotypen im Bereich der Mikropyle sowie des Embryosacks der Samenanlagen zu einer Zunahme der Calciumakkumulation (Abb. 22).

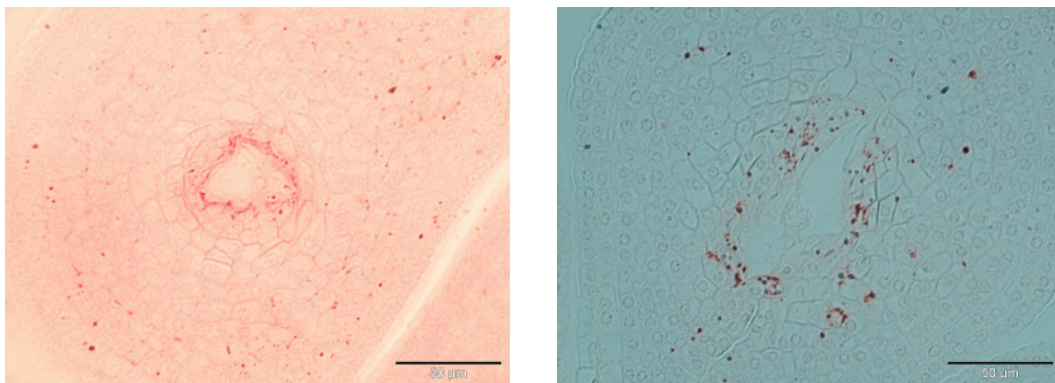
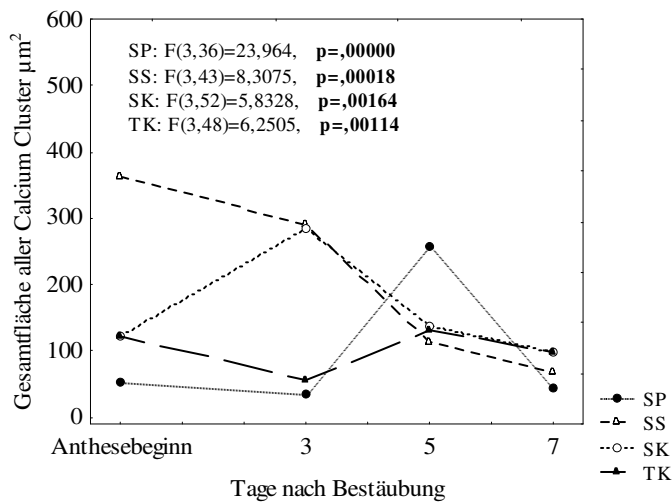


Abb. 22. Calciumcluster im Bereich der Mikropyle (links) und den Embryosack umgebend (rechts).

Alle untersuchten Genotypen zeigten einen vergleichbaren Verlauf der Calciumeinlagerung.

Es kam zunächst zu einer Zunahme der Calciumakkumulation und im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung zur kontinuierlichen Abnahme vor allem im Bereich des Embryosacks. Die untersuchten Genotypen unterschieden sich jedoch erheblich im jeweiligen Zeitpunkt der Zunahme bzw. Abnahme der Calciumakkumulation (Tab. 10, Abb. 23). Bei den Genotypen SP und TK wurde erst 5 Tage nach Bestäubung der Blüten die maximale Calciumeinlagerung beobachtet. Dahingegen war dies bei den Genotypen SS und SK bereits zu Anthesebeginn bzw. 3 Tage nach Bestäubung festzustellen.



Tab. 10. Genotypenvergleich bezüglich Calciumeinlagerung zu verschiedenen Zeiten. Gleiche Buchstaben innerhalb der jeweiligen Untersuchungszeiträume bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen zu diesem Zeitpunkt. Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$, TnB=Tage nach Bestäubung.

Genotyp	Gesamtfläche der Calcium Cluster in μm^2			
	Anthesebeginn	3TnB	5TnB	7TnB
SP	53,9 <i>a</i>	36,3 <i>a</i>	256,5 <i>a</i>	45,6 <i>a</i>
SK	123,7 <i>a</i>	284,2 <i>b</i>	136,1 <i>b</i>	99,6 <i>a</i>
TK	120,9 <i>a</i>	55,5 <i>a</i>	130,6 <i>b</i>	99,1 <i>a</i>
SS	363,1 <i>b</i>	290,6 <i>b</i>	112,4 <i>b</i>	67,4 <i>a</i>

Abb. 23. Vergleichende Darstellung der Calciumeinlagerung in den Samenanlagen aller Genotypen zu verschiedenen Zeitpunkten, basierend auf der Ermittlung der Gesamtfläche der detektierten Calciumcluster. Varianzanalyse multifaktoriell $\alpha=0,05$, $n = 25$ Blüten je Genotyp.

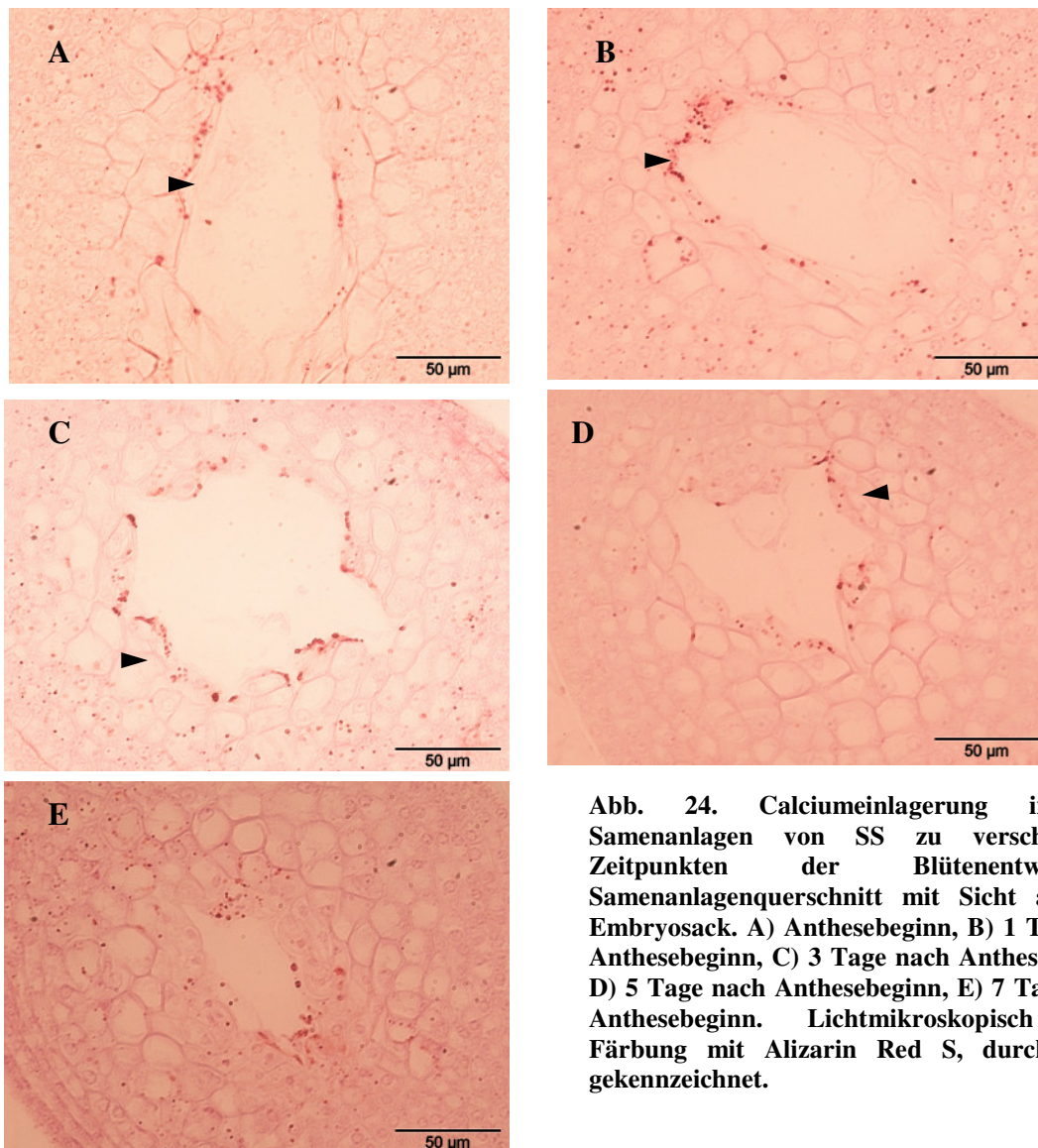


Abb. 24. Calciumeinlagerung in den Samenanlagen von SS zu verschiedenen Zeitpunkten der Blütenentwicklung. Samenanlagenquerschnitt mit Sicht auf den Embryosack. A) Anthesebeginn, B) 1 Tag nach Anthesebeginn, C) 3 Tage nach Anthesebeginn, D) 5 Tage nach Anthesebeginn, E) 7 Tage nach Anthesebeginn. Lichtmikroskopisch nach Färbung mit Alizarin Red S, durch Pfeile gekennzeichnet.

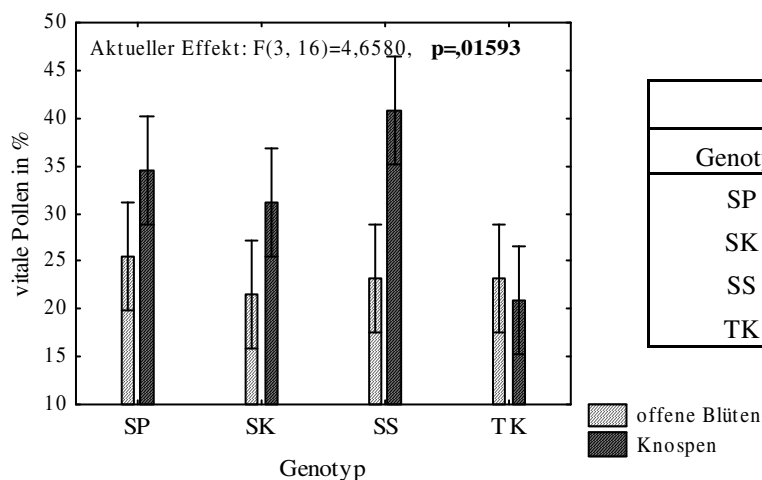
Auffallend war, dass die Calcium Cluster vor allem im Bereich des Embryosacks und darüber hinaus um die Mikropyle herum angeordnet waren (Abb. 24). Mit fortschreitender Blütenentwicklung lagerten sich die einzelnen Cluster zudem zu größeren Aggregaten zusammen. Nach Erreichen der maximalen Calciumakkumulation lösten sich diese Aggregate auf und auch die Cluster waren hier nur noch vereinzelt sichtbar. Jedenfalls konnte ein deutlicher Rückgang der Calciumeinlagerung beobachtet werden.

3.2. Samenentwicklung und Samenqualität

3.2.1. Pollenvitalität

Um auszuschließen, dass die Qualität des zur Bestäubung verwendeten Pollens ursächlich für einen verminderten Samenertag war, wurde die Vitalität des Pollens festgestellt.

Bei allen untersuchten Genotypen war die Pollenvitalität in Blütenknospen ca. 1-2 Tage vor Anthesebeginn höher als in offenen Blüten, 1-2 Tage nach Anthesebeginn (Abb. 25, 26). In offenen Blüten waren die Genotypenunterschiede in der Pollenvitalität geringer als in den Knospen. Hier hatte SS eine deutlich höhere Pollenvitalität als die anderen Genotypen.



Werte Verteilung zu Abb. 25

	offene Blüten	Knospen
Genotyp	vital in %	vital in %
SP	25,5 ac	34,5 bc
SK	21,5 a	31,1 ab
SS	23,3 a	40,7 b
TK	23,2 ac	21,0 a

Abb. 25. Pollenvitalität in Abhängigkeit von Genotyp und Variante. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle, $n_{\text{off.Blüten}} = 300$ Pollen je Genotyp, $n_{\text{Knospen}} = 300$ Pollen je Genotyp.

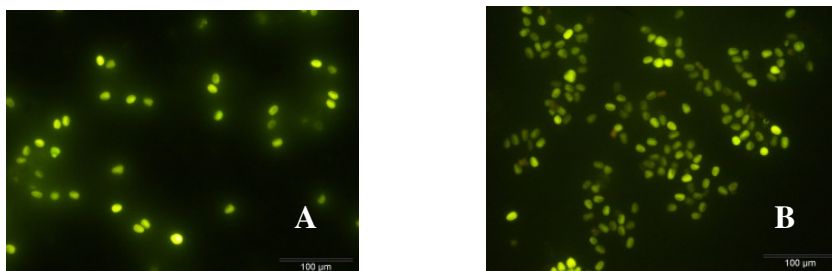


Abb. 26. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen vitaler und nicht vitaler Pollen. Variante A) - Knospe, Variante B)-offene Blüte. Stark leuchtende Pollenkörner wurden als vital beurteilt, schwach bzw. nicht Leuchtende als nicht vital.

3.2.2. Samenentwicklung

Es war nicht bekannt, ob bei *Cyclamen* der Beginn der Entwicklung des generativen Apparats der Samenanlagen an einer Plazenta synchron erfolgte.

3.2.2. 1. Untersuchungen zur Megasporenmutterzellentwicklung

Durch die Färbung der Samenanlagen und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Analyse konnte die Entwicklung der Megasporenmutterzelle dokumentiert werden. Etwa 5 Tage vor Anthesebeginn war die meiotische Teilung der Megasporenmutterzelle deutlich zu erkennen (Abb. 27A). Dieser Vorgang wurde etwa um die Zeit des Anthesebeginns beendet. Zu diesem Zeitpunkt waren keinerlei meiotische Teilungen der Megasporenmutterzelle mehr nachweisbar.

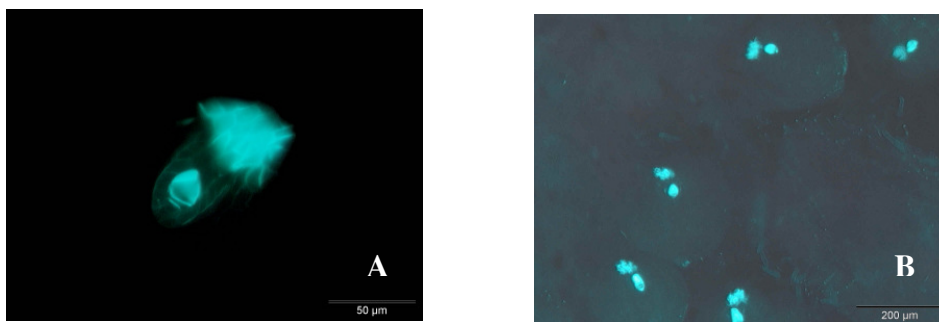


Abb. 27. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Teilung der Megasporenmutterzelle (links). Synchrone Teilungen der Megasporenmutterzellen in den Samenanlagen einer Plazenta, rechts

Bei der Betrachtung aller Samenanlagen an einer Plazenta wurde ersichtlich, dass dieser Vorgang bei allen vergleichbar ablief (Abb. 27B). Es konnte daher beobachtet werden, dass bezüglich des Beginns der Meiose keine Unterschiede existierten, sodass die generative Entwicklung aller Samenanlagen an einer Plazenta bis zum Anthesebeginn als zeitlich synchron betrachtet werden konnte. Somit wurde im Ergebnis festgestellt, dass zum Zeitpunkt des Anthesebeginns, und damit auch zum Zeitpunkt der Bestäubung die generativen Einheiten im Embryosack vollständig ausgebildet, und dass bezüglich der Samenanlagen untereinander alle in ihrer Entwicklung gleich weit fortgeschritten waren.

3.2.2. 2. Pollenschlauchwachstum

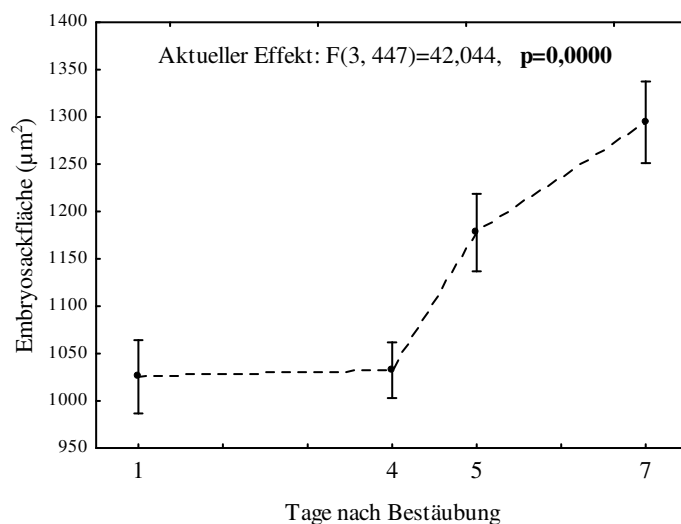
An Samenanlagen nach induzierter Bestäubung wurde zunächst der generelle Verlauf des Pollenschlauchwachstums untersucht (Tab. 11). Diese Untersuchung wurde am Genotyp SP durchgeführt. Bereits 4 Tage nach Bestäubung zu Anthesebeginn war eine große Anzahl Pollenschläuche durch den Griffel gewachsen und hatte die Plazenta erreicht. Die Anzahl der Pollenschläuche, die die Plazenta erreichten, nahm im weiteren zeitlichen Verlauf kontinuierlich zu, wobei bereits 7 Tage nach Bestäubung aufgrund der Vielzahl der durchgewachsenen Pollenschläuche eine zuverlässige Zählung nicht mehr möglich war. Bereits 4 Tage nach Bestäubung war außerdem

eine Vielzahl Pollenschläuche zu erkennen, die in die Samenanlagen eingewachsen waren. Die in Tabelle 11 gezeigten Ergebnisse stellen Mittelwerte dar. Die aufgeführte Abnahme der eingewachsenen Pollenschläuche 6 Tage nach Bestäubung ist experimentell bedingt.

	mittlere Anzahl Pollenschläuche	mittlere Anzahl Pollenschläuche
TnB	absolut	eingewachsen
4 TnB	127	30
5 TnB	190	106
6 TnB	212	72
7 TnB	508	174
8 TnB	561	-

Tab. 11. Mittlere Anzahl Pollenschläuche, die Plazenta erreichend (absolut) und eingewachsen, n Tage nach Bestäubung (TnB), n_{ges.} = 22 Plazenten.

Weiterhin war zu beobachten, dass ab 5 Tagen nach der Bestäubung eine Größenzunahme der Embryosäcke durch das Anwachsen des Endosperms stattfand (Abb. 28).



Werte Verteilung zu Abb. 28

TnB	ES-Fläche
1	1025,4
4	1032,4
5	1177,7
7	1294,3

Abb. 28. Darstellung der Zunahme der Embryosackflächen (n) Tage nach Bestäubung (ANOVA). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle, am Beispiel SP, n_{ges.} = 1709 Samenanlagen.

3.2.2.3. Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse befruchteter Samenanlagen

Die Untersuchungen zur Entwicklung und Differenzierung bestäubter Samenanlagen wurden mittels Flowcytometer durchgeführt (Abb. 29). Die Untersuchungen erfolgten am Genotyp SS. Es wurden ausschließlich triploide Anteile im Samen erfasst, die diploiden Anteile im Samen wurden nicht analysiert. Zunächst ist festzuhalten, dass die Bildung des triploiden Endosperms bei den untersuchten Pflanzen erst ca. 32 Tage nach Bestäubung mittels Flowcytometrie nachgewiesen werden konnte (Abb. 29A). Der Abschluss der Mitoseaktivität der triploiden und der hexaploiden Endospermanteile wurde mit dieser Methode ca. 63 Tage nach der Bestäubung nachgewiesen (Abb. 29E). Zwischen 32 Tagen und 42 Tagen nach Bestäubung kam es zu einer deutlichen Zunahme der triploiden Endospermanteile von 46 % auf 61 % (Abb. 30), und zur Abnahme der in Mitose befindlichen hexaploiden Anteile des Endosperms von 17 % auf 14 %. Ab 56 Tagen nach Bestäubung wurde mit

8% nur noch geringe Mitoseaktivität beobachtet. Die Anteile des triploiden Endosperms waren mit 71% relativ konstant. Somit ist im Ergebnis festzustellen, dass der Anteil des triploiden Endosperms bis 56 Tage nach Bestäubung deutlich zunahm und durch die Abnahme des hexaploiden Anteils des Endosperms die Mitoserate bis zu diesem Zeitpunkt dementsprechend gesunken ist. Zwischen 56 und 63 Tagen nach Bestäubung kam die Endospermentwicklung allmählich zum Erliegen (Abb. 30, Tab. 12).

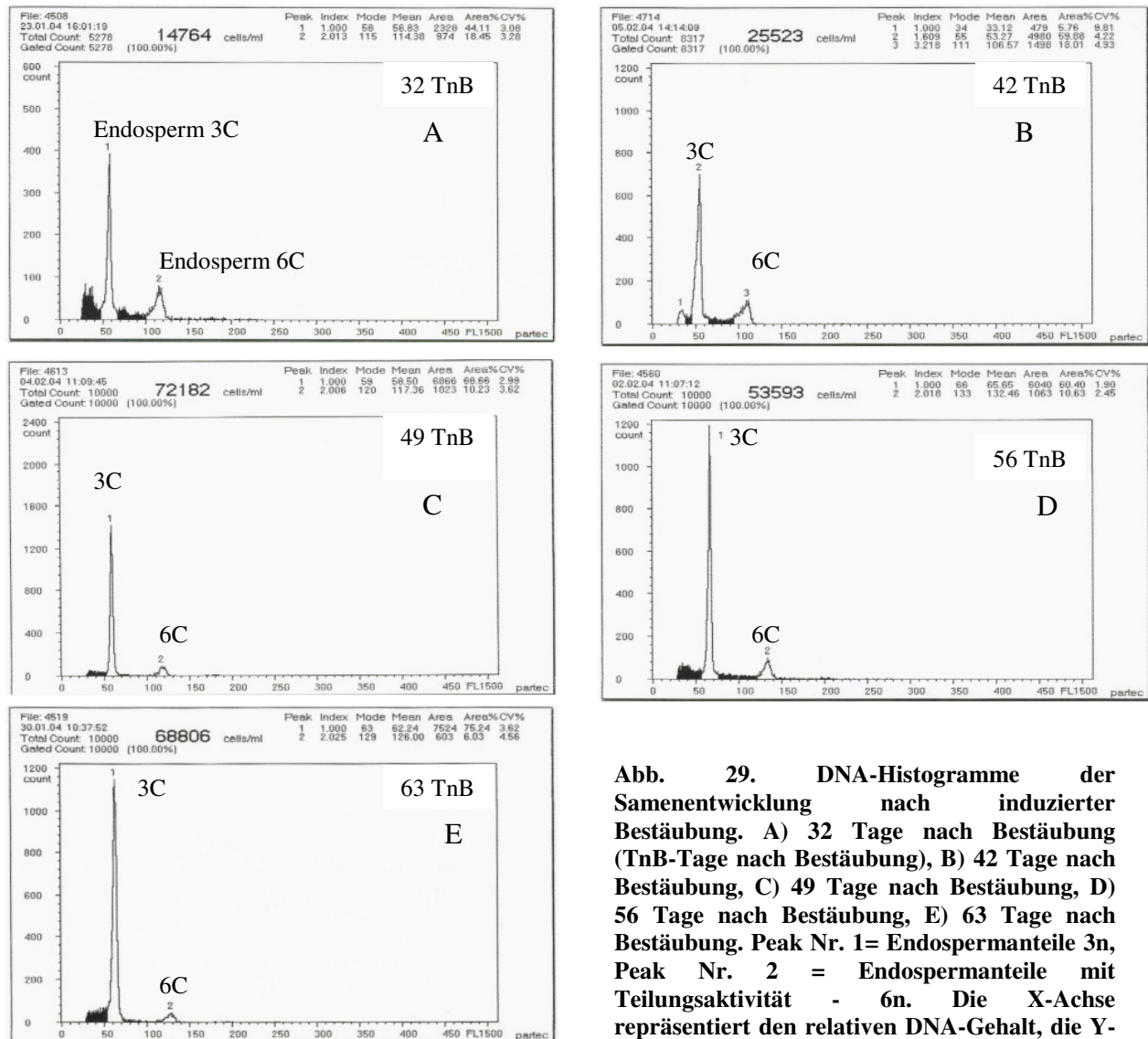


Abb. 29. DNA-Histogramme der Samenentwicklung nach induzierter Bestäubung. A) 32 Tage nach Bestäubung (TnB-Tage nach Bestäubung), B) 42 Tage nach Bestäubung, C) 49 Tage nach Bestäubung, D) 56 Tage nach Bestäubung, E) 63 Tage nach Bestäubung. Peak Nr. 1 = Endospermanteile 3n, Peak Nr. 2 = Endospermanteile mit Teilungsaktivität - 6n. Die X-Achse repräsentiert den relativen DNA-Gehalt, die Y-Achse repräsentiert die Anteile, n = 5 Blüten je Untersuchungszeitraum und Genotyp, 10000 Partikel.

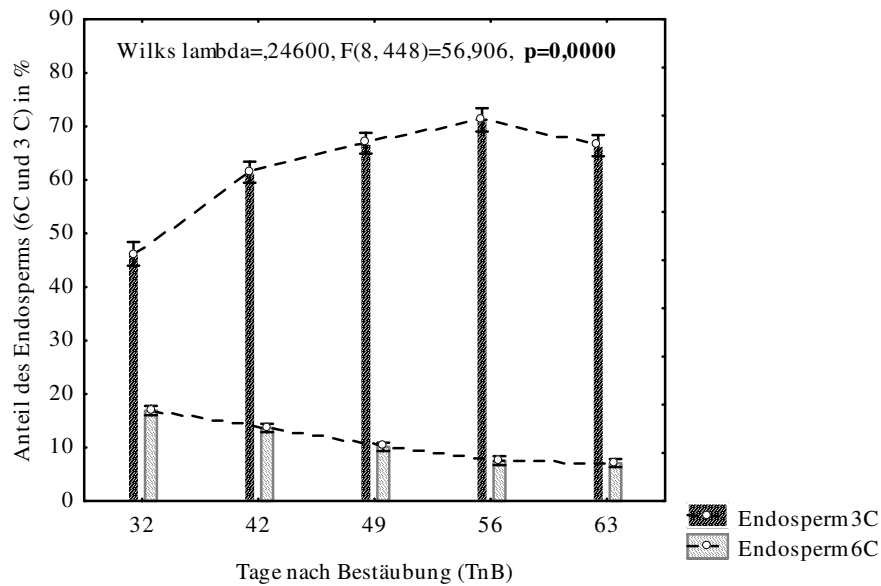


Abb. 30. Darstellung der Samenentwicklung beim Genotyp SS. Mittlerer Anteil des Endosperms 3C und 6C in % (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle.

Tab. 12. Samenentwicklung bei SS (n) Tage nach Bestäubung (TnB) in %. Mit gleichen Buchstaben innerhalb der Spalten gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

TnB	Anteil Endosperm in %		
	3C	6C	3C + 6C
32	46 a	17 a	63 a
42	61 b	14 b	75 b
49	67 c	10 c	77 b
56	71 d	8 d	79 b
63	66 c	7 d	73 b

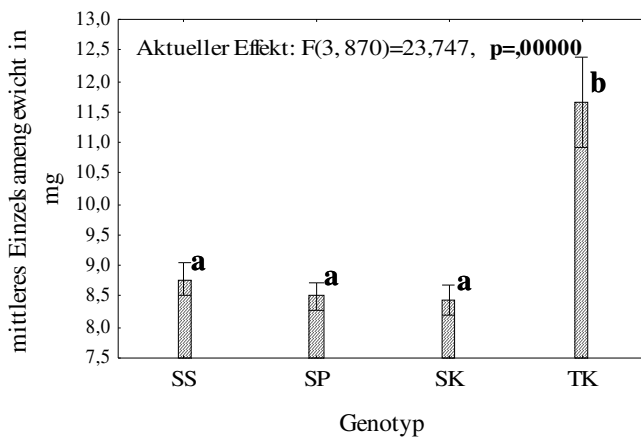
3.2.3. Samenqualität

Neben den Prozessen der Entwicklung und Differenzierung der Samenanlagen wurden Untersuchungen zur Samenqualität durchgeführt. Dazu wurden nachfolgend ausgewählte Qualitätsparameter untersucht.

3.2.3. 1. Samengewicht

Es wurden von allen Genotypen das mittlere Einzelsamengewicht in mg festgestellt. Der Genotyp TK unterschied sich bezüglich des Samengewichtes erheblich von den diploiden Genotypen. Die untersuchten diploiden Genotypen unterschieden sich in diesem Merkmal nicht signifikant voneinander (Abb. 31). Mittels planimetrischer Analyse wurde bei SK die Größe der Samen bestimmt

und mit dem Samengewicht verglichen (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Samenfläche korrelierte mit $r = 0,74$, $p \leq 0,0001$ stark mit dem Samengewicht.



Werteverteilung zu Abb. 31

Genotyp	mittleres Einzelsamengewicht in mg
SS	8,8
SP	8,5
SK	8,4
TK	11,7

Abb. 31. Vergleichende Darstellung der mittleren Einzelsamengewichte aller Genotypen (ANOVA). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle.

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass mit zunehmendem Alter der Kapsel das mittlere Einzelsamengewicht zunahm. Dieser Effekt zeigte sich vor allem bei den Genotypen SS und SP (Abb. 32). Die schließlich festgestellte Abnahme des mittleren Samengewichts war verbunden mit einer starken Zunahme der Streuung der ermittelten Werte.

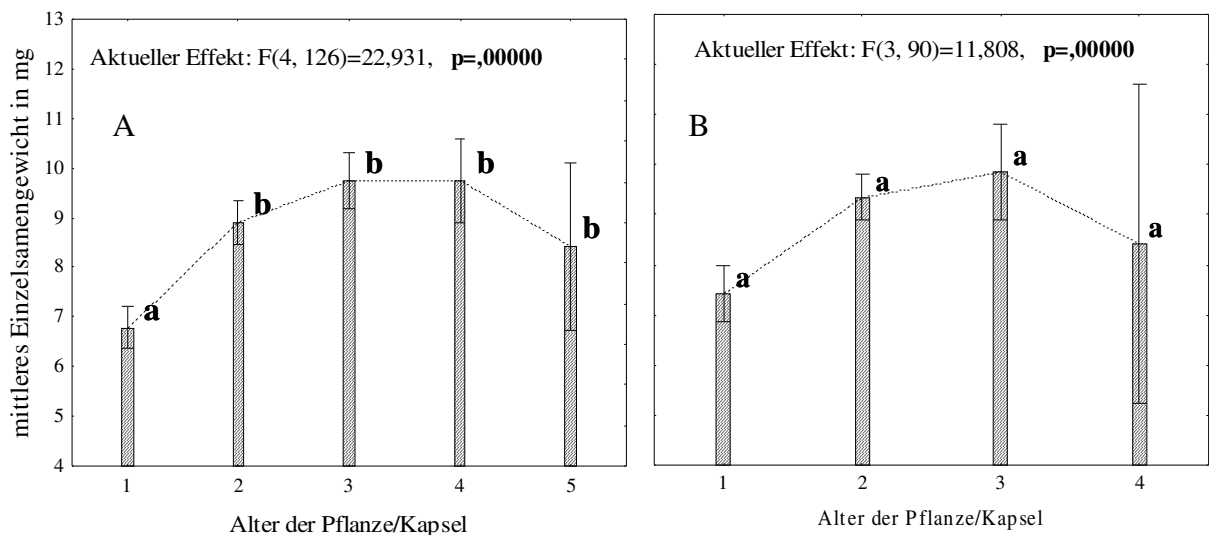


Abb. 32. Darstellung der Veränderung des mittleren Einzelsamengewichts mit zunehmendem Kapselalter, (A) SP, (B) SS. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte innerhalb der Genotypen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. Kapsel Alter 1 = in der Bestäubungsfolge zuerst bestäubte Blüte (Mitte November 2002 bis Kapsel Alter 4 bzw. Alter 5 = in der Bestäubungsfolge zuletzt bestäubte Blüte (Februar 2003). Nähere Erläuterung ↑ Pkt. 2.2.1, Tab. 4.

Werte Verteilung zu Abb. 32

Alter	mittleres Einzelsamengewicht in mg	
	SP	SS
1	6,8	7,4
2	8,9	9,3
3	9,8	9,9
4	9,7	8,4
5	8,4	-

3.2.3. 2. Ausgewählte Sameninhaltsstoffe als innere Qualität der Samen

Zur Untersuchung der inneren Qualität reifer Samen wurden ausgewählte Sameninhaltsstoffe, wie Kohlenhydrate, Proteine und Lipide unspezifisch analysiert. Neben der biochemischen Untersuchung erfolgte auch eine mikroskopische Analyse.

Biochemische Inhaltsstoffanalyse

In methodischer Hinsicht sollte zunächst geklärt werden, ob eine biochemische Inhaltsstoffbestimmung für ausgewählte Sameninhaltsstoffe geeignet ist, repräsentative Aussagen über die jeweilige Konzentration im Samen treffen zu können. Dabei sollten vor allem Einzelkornanalysen durchgeführt werden.

A) Kohlenhydratanalyse an reifen Samen

Die Kohlenhydratanalyse wurde an drei verschiedenen Einzelpflanzen innerhalb des Genotyps SS durchgeführt, um zu testen, inwieweit die Mutterpflanze einen Einfluss auf die Kohlenhydratkonzentration ausübt.

Bezüglich der Glucose-, Fructose- und Saccharosekonzentration wurden quantitative Analysen an reifen Samen durchgeführt. Als reif wurden Samen definiert, die aus Kapseln mit weichem Kapselstiel entnommen wurden. Bei ihnen war davon auszugehen, dass eine Versorgung durch die Mutterpflanze physiologisch nicht mehr möglich war.

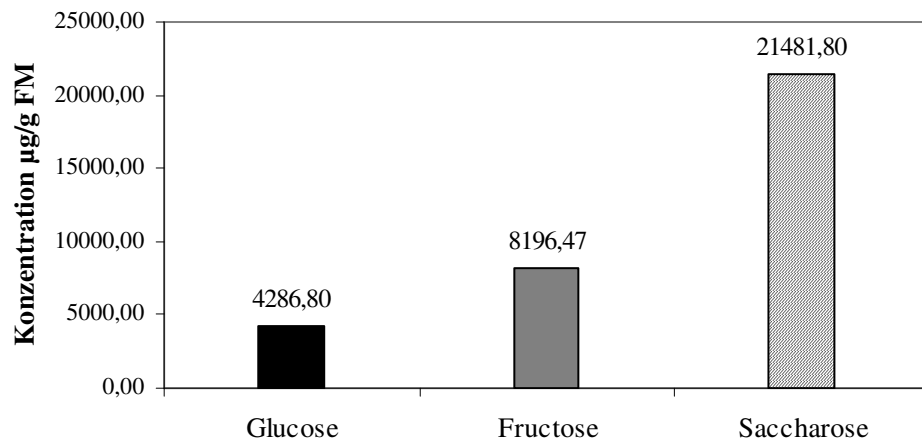


Abb. 33. Mittlere Kohlenhydratgehalte im Samen von SS (n = 199). Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (T-Test, $\alpha=0,05$). FM = Frischmasse

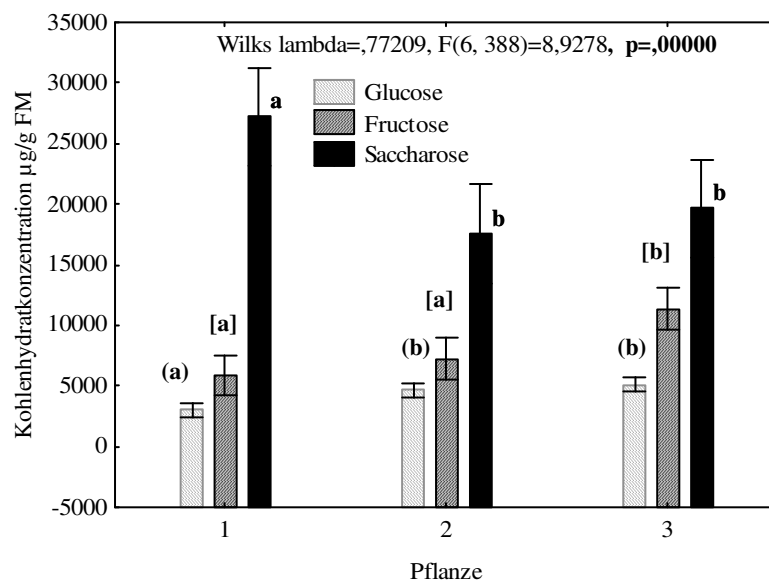


Abb. 34. Einzelpflanzenvergleich von SS bezüglich der Anteile der untersuchten Kohlenhydrate. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte innerhalb der einzelnen Kohlenhydrate unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle.

Es war ersichtlich, dass der Anteil der Saccharose im Vergleich zur Glucose und Fructose im Samen erheblich höher war (Abb. 33). Im Vergleich der reduzierten Zucker untereinander zeigte sich, dass der Fructosegehalt gegenüber dem Glucosegehalt dominierte. Glucose war in geringsten Anteilen vorhanden. Zwischen den untersuchten Pflanzen konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Gesamtkohlenhydratkonzentration festgestellt werden (Abb. 34). Auch das Alter der Kapsel hatte offensichtlich einen Einfluss auf den Gesamtkohlenhydratgehalt der Samen in der Form, dass der Gehalt mit zunehmendem Alter der Kapsel anstieg (Abb. 35).

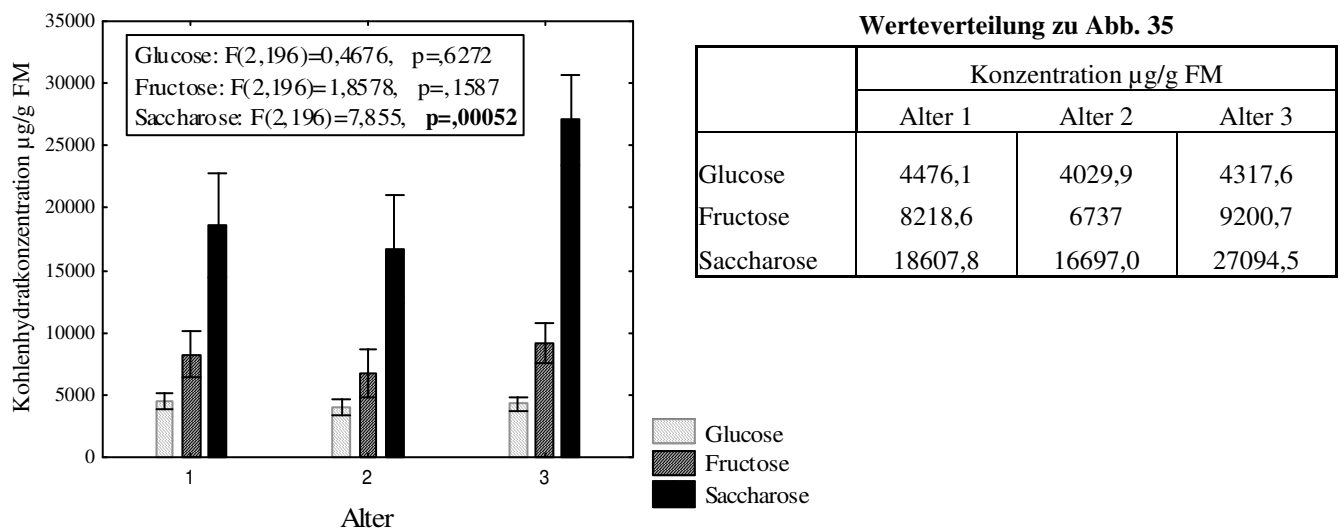


Abb. 35. Veränderung der Kohlenhydratkonzentrationen mit zunehmendem Kapselalter am Beispiel von Genotyp SS. Varianzanalyse multifaktoriell $\alpha=0,05$. Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. Das angegebene Alter der Kapseln bezieht sich auf die Bestäubungsreihenfolge der Blüten. ↑Pkt. 2.2.1, Tab. 4

Dies konnte vor allem bezüglich des Saccharosegehaltes festgestellt werden. Jedoch im Hinblick auf die Einzelkomponenten Glucose und Fructose war dies nicht deutlich ausgeprägt, obgleich auch hier eine Tendenz erkennbar war (Abb. 36).

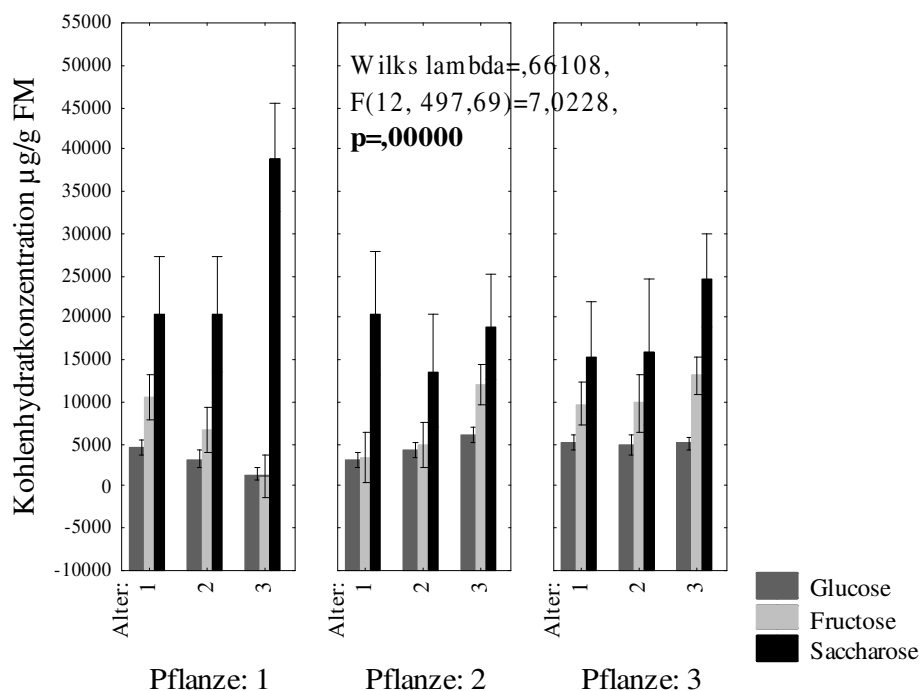


Abb. 36. Veränderung der Kohlenhydratkonzentrationen mit zunehmendem Kapselalter am Beispiel vom Genotyp SS. Vergleich Einfachzucker und Saccharose (links) und innerhalb der Einzelpflanzen von SS (rechts). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. Das angegebene Alter der Kapseln bezieht sich auf die Bestäubungsreihenfolge der Blüten, ↑Pkt. 2.2.1, Tab. 4.

B) Quantitative Analyse löslicher Proteine im Samen

Die Quantifizierung der wasserlöslichen Proteine an reifen Einzelsamen diene der Überprüfung, ob der Anteil dieser Proteingruppe einen Einfluss auf die Samenqualitätsparameter Keimfähigkeit und Triebkraft ausübt. Weiterhin sollte die Nachweisführung soweit modifiziert werden, dass lösliche Proteine in Einzelkornanalysen zerstörungsfrei bestimmt werden, sodass die untersuchten Samen für darauf folgende Keimfähigkeits- und Triebkrafttests verwendet werden können.

Es war nicht bekannt, ob es bei *Cyclamen* eine direkte Beziehung der Konzentration der löslichen Proteine mit der Keimfähigkeit und der Triebkraft gibt. Der Vorversuch am Genotyp SK erbrachte die nötigen Daten zu dem erforderlichen Probenumfang, dem Versuchsaufbau und die optimalste Probenvorbereitung. Die Samenpräparation erfolgte hier nach der Schleifpapiermethode unter vollständiger Zerstörung des Probenmaterials. Die einzelnen Samen unterschieden sich zum Teil erheblich voneinander bezüglich der Konzentration an löslichen Proteinen. Auch bei der Analyse von Einzelpflanzen des Genotyps SK wurden signifikante Unterschiede von bis zu 2 % beobachtet (nicht dargestellt).

Die beschriebene Samenpräparation zur Analyse der löslichen Proteine mittel vollständiger Zermahlung der Samen mit Schleifpapier hatte den Nachteil, dass der Samen dabei vollständig zerstört wurde und für weitere Untersuchungen, z.B. Keimversuche nicht mehr zur Verfügung stand.

Die Extraktion löslicher Proteine durch die Heißwasserbehandlung war dagegen als nichtdestruktive Methode geeignet. Die hiermit erzielten Resultate waren mit jenen vergleichbar, welche sich durch die Schleifpapiermethode ergaben. Beide Werte korrelieren miteinander ($r = 0,70$, $p = 0,02$). Die Mittelwerte aus beiden Methoden wichen nur geringfügig voneinander ab, ebenso die Standardfehler. Die Heißwassermethode war insgesamt als genauer einzustufen (Tab. 13). Sie erwies sich im Rahmen der Untersuchung auch als effektiver, da aufgrund der vereinfachten Probenvorbereitung ein höherer Probenumfang in der gleichen Zeit untersucht wurde, als mit der Schleifpapier Methode.

Tab. 13. Vergleich der beiden Methoden zur Probenaufbereitung für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach BRADFORD, am Beispiel Genotyp SK.

Heißwassermethode			Zerreibe-Methode		
	Extinktion E= 595 nm	µg Protein		Extinktion E= 595 nm	µg Protein
MW	0,440	12,054	MW	0,444	12,153
Stabw.	0,118	3,224	Stabw.	0,141	3,861
cv %		26,75	cv %		31,77

Im Vergleich der Genotypen wies SS mit 10,9 µg/ml insgesamt die höchste Konzentration an löslichen Proteinen auf (Abb. 37 links). Der Anteil löslicher Proteine war dagegen mit 7,6 µg/ml bei SP am geringsten. Die Konzentration löslicher Proteine beim Genotyp SK unterschied sich mit 10,4 µg/ml nicht signifikant von der bei SS. Auch zwischen den untersuchten Einzelpflanzen innerhalb eines Genotyps existierten erhebliche Unterschiede in der Konzentration löslicher Speicherproteine (Abb.37 rechts).

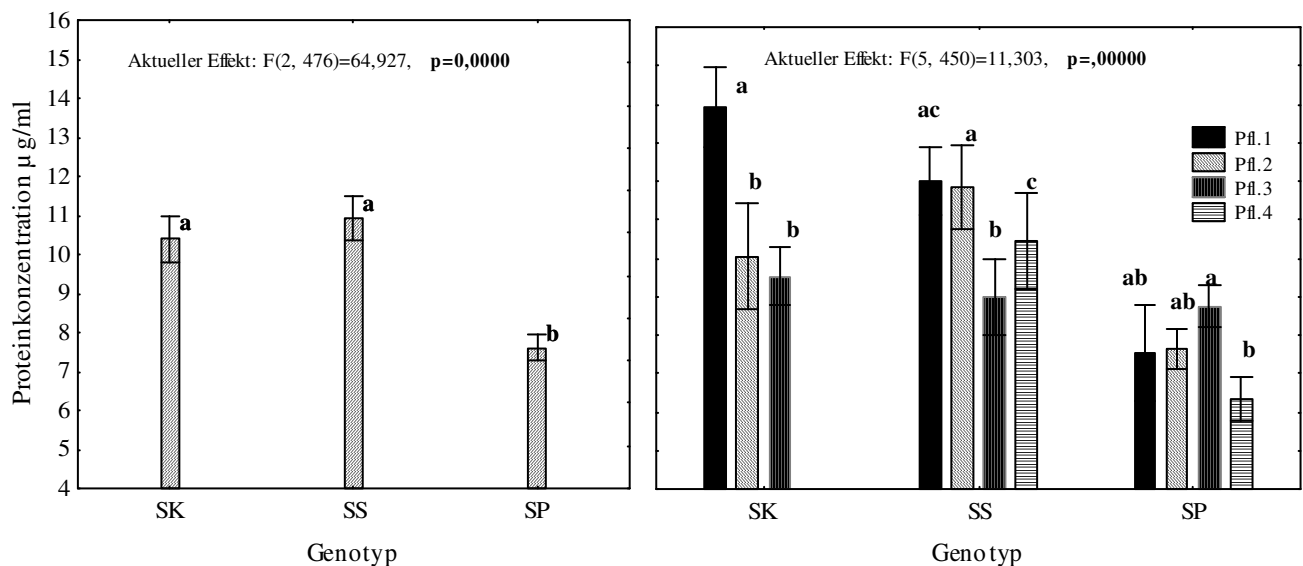


Abb. 37. Vergleich der Genotypen (links) und der Einzelpflanzen innerhalb der diploiden Genotypen (rechts) hinsichtlich der Proteinkonzentration. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. n = 100 Samen je Genotyp

Es war nicht bekannt, ob das Alter der Kapsel an den Einzelpflanzen einen Einfluss auf die Konzentration der löslichen Proteine hatte. Daher wurden innerhalb des Genotyps SP an drei Einzelpflanzen jeweils drei Kapseln unterschiedlichen Alters bezüglich der Konzentration löslicher Proteine untersucht. Mit Alter der Kapsel war auch hier wieder der Zeitpunkt der Bestäubung gemeint, wobei die Kapsel mit dem Alter 1 zuerst und die Kapsel mit dem Alter 3 zuletzt bestäubt wurden. Es konnte an allen drei Einzelpflanzen gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter der Kapsel, die Konzentration an löslichen Proteinen in den Samen zunahm (Abb. 38).

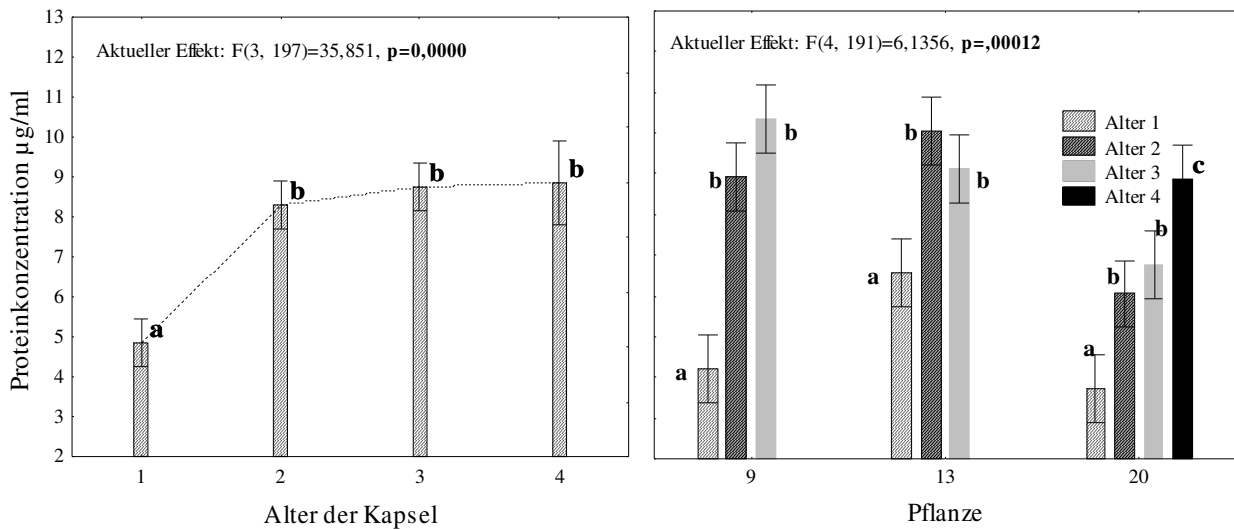


Abb. 38. Veränderung der Konzentration löslicher Proteine mit zunehmendem Kapselalter (↑ Pkt. 2.2.1 u. Tab. 4) bei SP allgemein (links) und innerhalb ausgewählter Einzelpflanzen (rechts). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle.

Werteverteilung zu Abb. 38 links

Alter der Kapsel	mittlerer Proteingehalt µg/ml
1	4,8
2	8,3
3	8,7
4	8,9

Korrelation von Kohlenhydratgehalt und Konzentration löslicher Proteine

Zur Klärung der Frage, ob der Kohlenhydratgehalt im Samen in Beziehung zur Konzentration löslicher Speicherproteine stand, wurde bei dem Genotyp SS eine Stichprobe aus jeweils 5 Samen aus den drei Einzelpflanzen untersucht, die zuvor bezüglich ihres Kohlenhydratgehaltes analysiert wurden. Es gab keine Beziehungen zwischen der Proteinkonzentration und der Glucose- sowie Fructose Konzentration in den Samen. Dagegen wurde zwischen der Proteinkonzentration und der Saccharosekonzentration eine hoch signifikante negative Korrelation festgestellt (Abb. 39).

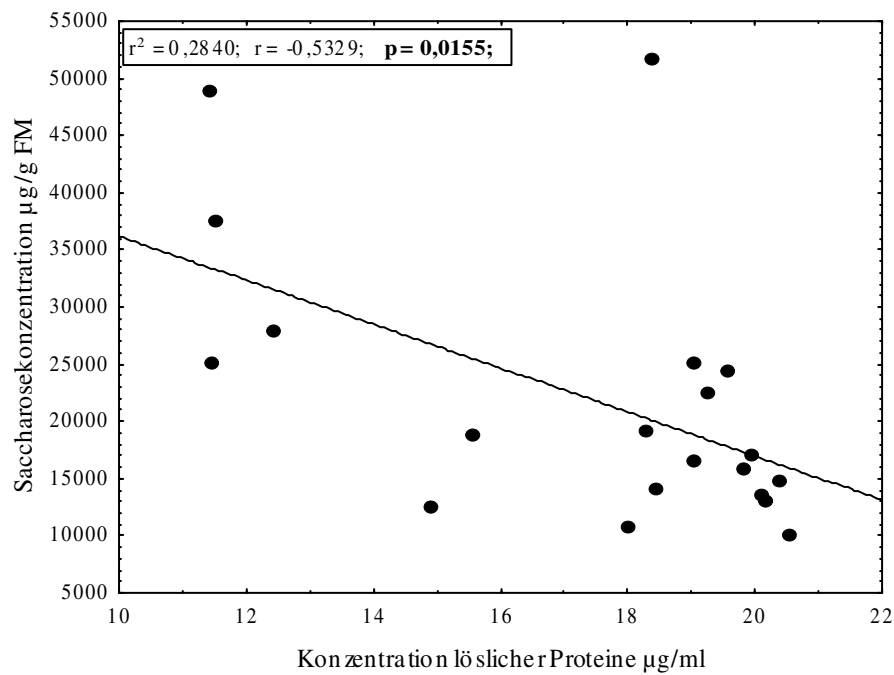


Abb. 39. Beziehung zwischen Saccharosegehalt und der Konzentration löslicher Proteine in Samen von SS. Regressionsanalyse

Mikroskopische Inhaltsstoffanalyse

Zunächst konnte bestätigt werden, dass das Endosperm reifer Cyclamensamen zunächst keine Zellwände besitzt und daher erst von nukleärer, später dann von zellulärer Bauart ist. Des Weiteren wurden im Bereich der Testa Kristalle beobachtet, die regelmäßig in der äußeren Samenschale eingelagert waren (Abb. 40). Die spezifische Zusammensetzung und der chemische Aufbau dieser Kristalle wurde nicht untersucht.

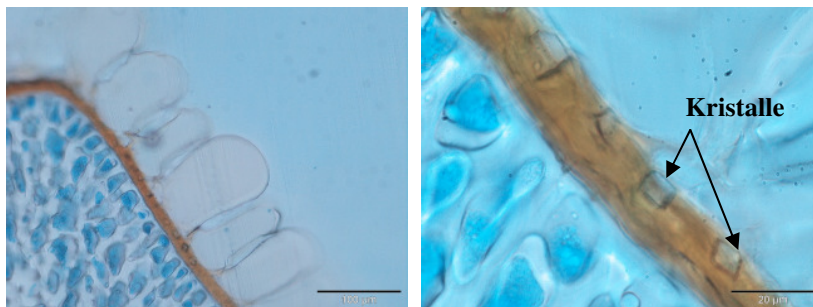


Abb. 40. Samenschale eines reifen Samens (links) und kristalline Einschlüsse in der Samenschale (rechts).

Im Rahmen der mikroskopischen Inhaltsstoffanalyse sollte vorrangig geklärt werden, ob es damit möglich ist, ausgewählte Inhaltsstoffe ebenso zu quantifizieren wie mit biochemischer Inhaltsstoffanalyse. Es wurden verschiedene Inhaltsstoffe wie Speicherproteine, Lipide und Kohlenhydrate im Endosperm reifer Samen analysiert.

A) Speicherproteine

Nach Färbung der Präparate kam es zu einer lokalen Blaufärbung bestimmter Bereiche im Samen (Abb. 41). Diese konnten aufgrund der Substratspezifität der Bradford Reaktion als Speicherproteine im Endosperm identifiziert werden. Sie waren im gesamten Samen verteilt, wobei im Bereich der Testa eine größere Dichte zu erkennen war. Im Bereich des Embryos, welcher im Endosperm eingebettet war, wurde ebenfalls eine höhere Proteindichte beobachtet, hier vor allem um den Embryo herum. Die Ergebnisse aus der biochemischen Proteinanalyse wurden bestätigt, wonach das Endosperm der Samen bei SS eine deutlich höhere Proteinkonzentration aufwies im Gegensatz zum Endosperm von SP (Abb. 42, Tab. 14).

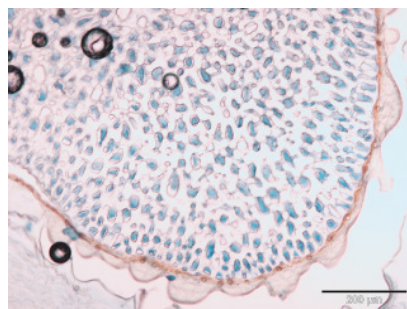


Abb. 41. Nachweis von Speicherproteinen im Endosperm nach Färbung mit BRADFORD Reagenz. Bereiche mit Proteinen sind blau gefärbt. n = 1 Kapsel in 3 Wiederholungen

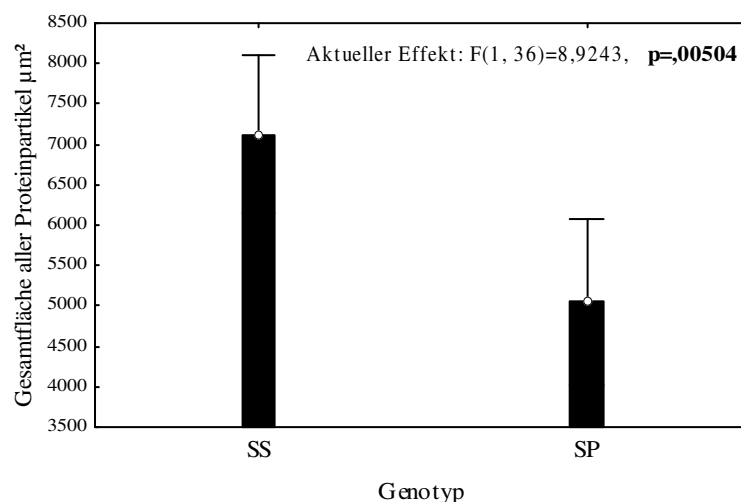


Abb. 42. Vergleichende Darstellung der Gesamtfläche der detektierten Proteinpartikel im Endosperm nach mikroskopischer Analyse der Genotypen SS und SP. Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle.

Tab. 14. Auswertung der mikroskopischen Proteinkonzentrationsbestimmung im Endosperm. T.O.A. (total object area) - Gesamtfläche der Proteinpartikel in µm², R.O.A. (relative object area)-Dichte der Proteinpartikel in %, A.O.A. (average object area) - durchschnittliche Größe der Proteinpartikel in µm², p - Wert = signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich der untersuchten Parameter.

Genotyp	Anzahl Partikel	p-Wert	T.O.A.	p-Wert	R.O.A.	p-Wert	A.O.A.	p-Wert
SP	100	0,026	5049,7	0,005	10,2	0,005	51,48	0,0000
SS	78		7123,8		14,3		96,79	

B) Lipide im Endosperm

Weiterhin wurde beim Genotyp SP die Lipiddichte im Endosperm der Samen ermittelt. Die Lipidpartikel hatten im Wesentlichen die Form von aggregierten Tropfen. Nach der spezifischen Färbung hoben sie sich als schwarze Partikel deutlich vom hellen Untergrund des übrigen Endosperms ab und konnten somit gemessen werden (Abb. 43).

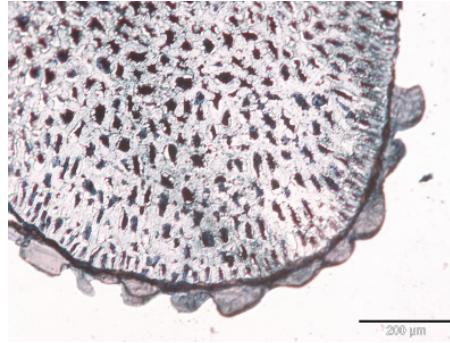
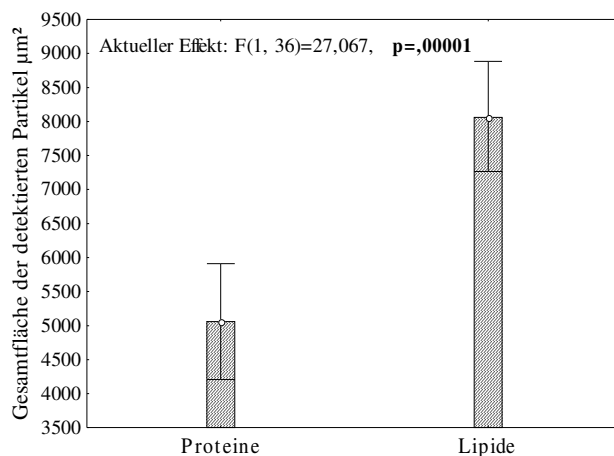


Abb. 43. Nachweis von Speicherlipiden im Endosperm nach Färbung mit Sudanschwarz. Bereiche mit Lipiden sind schwarz gefärbt. n=1 Kapsel in 3 Wiederholungen

Im Vergleich zu den vorher detektierten Proteinartikeln fiel auf, dass die Lipidartikel signifikant dichter gelagert waren und aus größeren Aggregaten bestanden als die Proteine (Abb. 44). Somit wurde deutlich, dass im Endosperm von Cyclamensamen mehr Lipide vorhanden sind als Proteine.



Werte Verteilung zu Abb. 44

	Anzahl Lipidpartikel (n)	Gesamtfläche in µm²	Dichte in %
Lipide	129	8068,1	16,2
Proteine	100	5049,7	10,2

Abb. 44. Vergleich der Anteile Proteine und Lipide im Endosperm reifer Samen von SP. Vertikale Balken bedeuten 0, 95 Konfidenzintervalle.

C) Kohlenhydrate im Endosperm

Die Färbung mit Lugolscher Lösung zeigte keine eindeutige Blau- oder Violett färbung bestimmter Bereiche des Endosperms. Somit konnte bestätigt werden, dass die Samen keine Stärke besaßen. Es kam nach ca. 10 Minuten zu einer leichten Blaufärbung in einigen Teilen des Endosperms, was darauf schließen ließ, dass eine stärkeähnliche Substanz, jedenfalls eine Substanz mit aggregierten

Glucoseeinheiten anwesend war, die geeignet war, Bindungsstellen für die Iodatome bereitzuhalten, um die beschriebene Blaufärbung auszulösen. Diese Blaufärbung war jedoch nur extrem schwach ausgeprägt und zum Teil in dem Bereich der Samenschale etwas stärker. Zumeist kam es zu einer unspezifischen und nicht definierten Dunkelgelb- bis Orangefärbung lokaler Bereiche (Abb. 45).

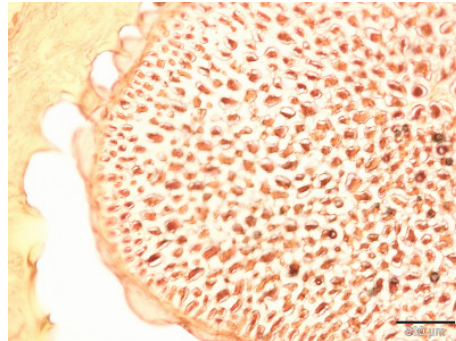


Abb. 45. Nachweis von Kohlenhydraten im Endosperm nach Färbung mit Lugolscher Lösung.

3.2.3. 3. Ergebnisse aus den Keimprüfungen

Die Untersuchungen sollten klären, ob zwischen dem ermittelten Gehalt ausgewählter Inhaltsstoffe und der Keimfähigkeit sowie der Triebkraft der Samen ein direkter Zusammenhang besteht.

Zunächst wurden erste allgemeine Untersuchungen zur Keimfähigkeit- und Triebkraft der Samen bzw. Keimlinge durchgeführt, um mögliche Unterschiede im Keimverhalten der Genotypen zu erfassen. Die Keimversuche wurden in drei Wiederholungen durchgeführt, wobei jeweils der Keimungsverlauf der Samen auf verschiedenen Nährmedien analysiert wurde. Die Keimfähigkeit differierte in Abhängigkeit vom Nährmedium (Abb. 46).

Auch zwischen den Genotypen wurden Unterschiede in der Keimfähigkeit beobachtet. Der Genotyp SP hatte im Vergleich zu den anderen diploiden Genotypen auf allen drei Nährmedien die höchste Keimfähigkeit. Bei den Genotypen SS und SK zeigte sich eine Zunahme der Keimfähigkeit auf Vermehrungssubstrat im Vergleich zu den Tests in den Kunststoffpetrischalen. Die Unterschiede, sowohl zwischen den Genotypen, als auch auf den einzelnen Nährmedien waren im Mittel tendenziell sehr deutlich, konnten jedoch statistisch nicht gesichert werden.

Wertevertelung zu Abb. 46. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$).

Genotyp	mittlere Keimfähigkeit in % (Anteil normal entwickelter Keimlinge)		
	Vorversuch Kunststoffpetrischalen	Versuch1 Glaspetrischalen	Substrat
SS	72,5 a	86 a	85 a
SP	93,5 a	90 a	92 a
SK	87 a	75 a	90 a

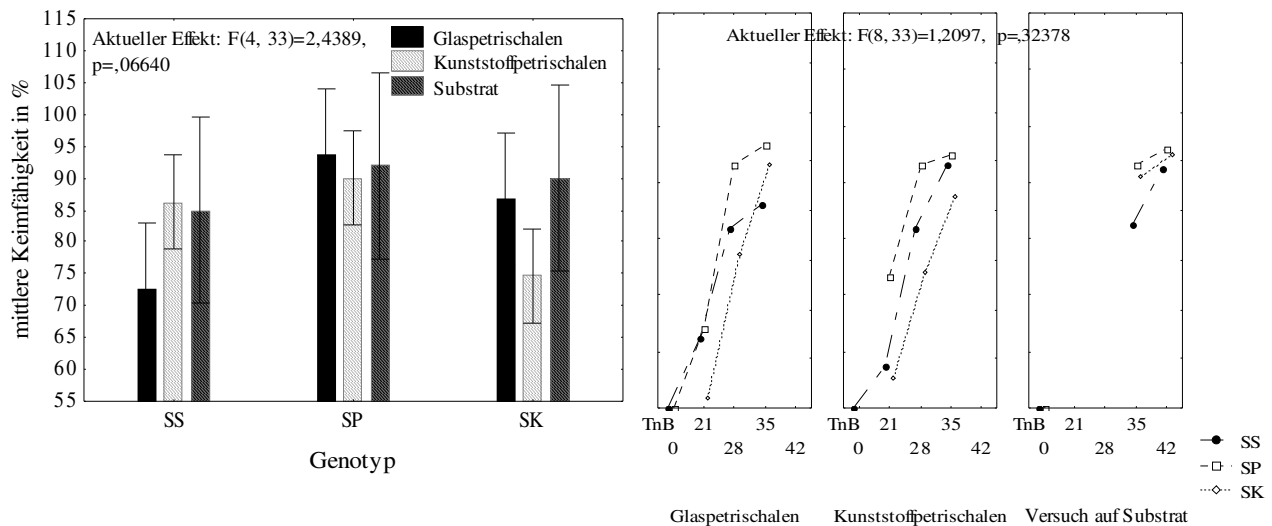


Abb. 46. Vergleichende Darstellung der mittleren Keimfähigkeit (links) und des Keimungsverlaufs (rechts) der diploiden Genotypen auf verschiedenen Nährmedien. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. $n_{\text{Vorversuch}} = 4 \times 50$ Samen je Genotyp, $n_{\text{Petriscchale}} = 4 \times 50$ Samen je Genotyp, $n_{\text{Substrat}} = 100$ Samen je Genotyp, TnB = Tage nach Bestäubung.

3.2.3. 4. Ergebnisse aus den Triebkraftprüfungen der Keimlinge

Als Maß für die Triebkraft wurde zunächst das Keimlingsgewicht gewählt.

Dabei fiel auf, dass das mittlere Keimlingsgewicht in den Glaspetrischalen deutlich geringer war, als in den Kunststoffpetrischalen (Abb. 47). Zwischen den untersuchten Genotypen gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede. Dagegen unterschied sich die Triebkraft von SP in den Kunststoffpetrischalen signifikant von der der Genotypen SK und SS.

Die Triebkraft von SP war in Substrat ebenso am größten. Hier waren die Unterschiede aber nicht signifikant. Die Tatsache, dass der Keimling bei der Keimung der Samen in Substrat gegen einen physischen Widerstand wachsen muss, induzierte die Notwendigkeit nur noch das Gewicht der unterirdischen Keimlingsteile Hypokotyl und Wurzeln zu ermitteln, um die Triebkraft zuverlässiger beurteilen zu können (Abb. 48). Zunächst zeigte sich, dass die Keimlinge in Substrat deutlich schwerer waren als die in den Petrischalen. Auch beim Versuch in Substrat existierten zwischen den untersuchten diploiden Genotypen zum Teil erhebliche Unterschiede in den Triebkraftparametern (Tab. 15). Hier besaß die SS die größte Triebkraft im Vergleich zu den anderen untersuchten Genotypen. Neben den Unterschieden zwischen den einzelnen Genotypen konnten aber auch Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen innerhalb der Genotypen festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

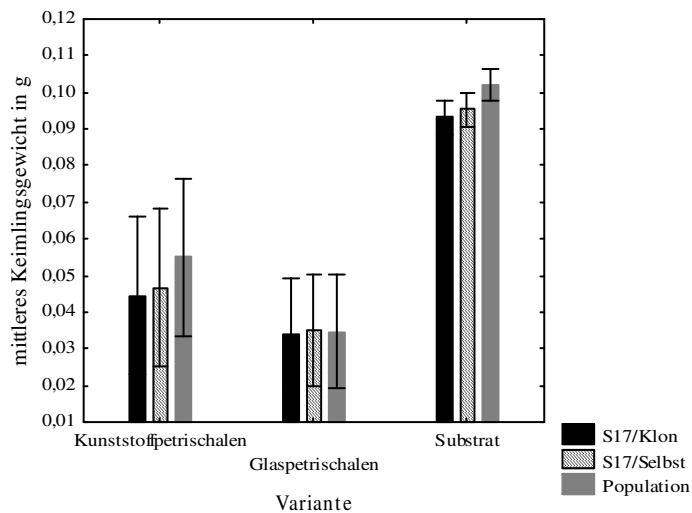


Abb. 47. Mittlere Keimlingsgewichte aller diploiden Genotypen aus allen Keimungsversuchen als Maß für die Triebkraft der Keimlinge. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. n Kunststoff = 200 Samen je Genotyp, n Glas = 200 Samen je Genotyp, n Substrat = 100 Samen je Genotyp.

mittleres Keimlingsgewicht in g			
Genotyp	Kunststoffpetrischalen	Glaspétrischalen	Substrat
SK	0,044 b	0,034 c	0,093 d
SS	0,046 b	0,035 c	0,095 d
SP	0,055 a	0,034 c	0,102 d

Werteverteilung zu Abb. 47

Tab. 15. Darstellung der Triebkraft der Keimlinge diploider Genotypen auf Substrat, Länge in cm, Gewicht in g.

Genotyp	gesamter Keimling		Keimling oberirdisch		Wurzel und Hypocotyl		Hypocotyl		Wurzel	
	Länge	Gewicht	Länge	Gewicht	Länge	Gewicht	Länge	Gewicht	Länge	Gewicht
SS	10,47	0,095	7,64	0,048	2,83	0,047	0,59	0,039	2,24	0,0076
SP	11,12	0,102	8,48	0,06	2,64	0,042	0,59	0,034	2,05	0,0074
SK	12,67	0,093	10,31	0,056	2,35	0,037	0,57	0,03	1,78	0,0065

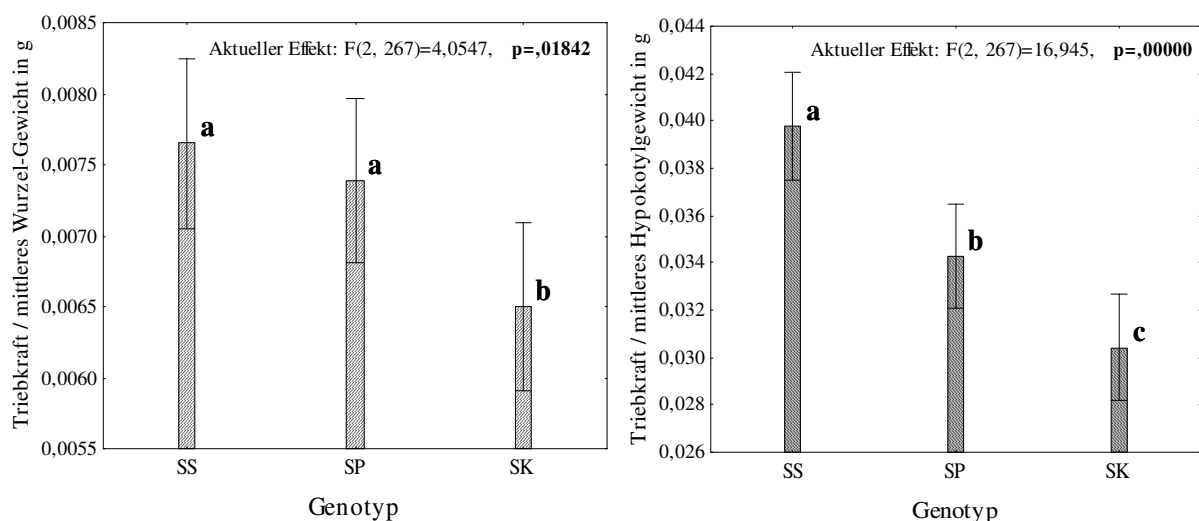


Abb. 48. Vergleichende Darstellung der Triebkraft der diploiden Genotypen auf Vermehrungssubstrat bezüglich Wurzelgewicht (links) und Gewicht von Wurzel und Hypocotyl (rechts). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. n = 100 Samen je Genotyp.

3.3. Einfluss der Samenanlagenposition an der Plazenta bzw. Samenposition in der Kapsel auf Samenanlagen- und Samenparameter

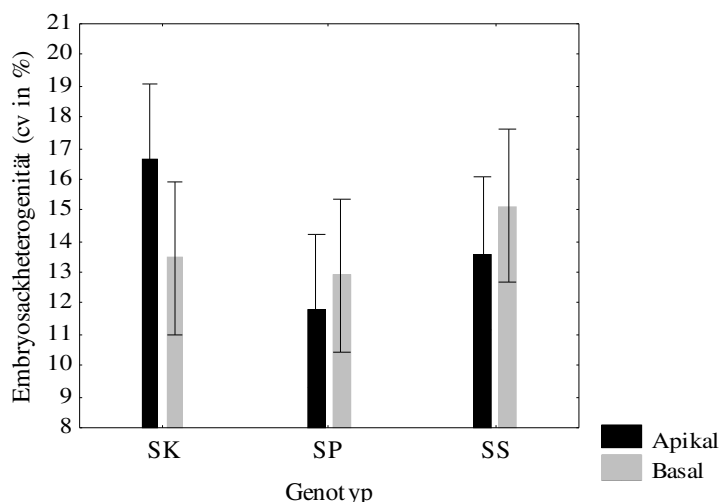
Es war nicht bekannt, inwieweit die Position der Samenanlage an der Plazenta bzw. des Samens in der Kapsel einen Einfluss auf die zuvor untersuchten Samenanlagenmerkmale sowie Samenparameter hinsichtlich Entwicklung und Qualität ausübte. Dazu wurden die Plazenten bzw. Kapseln in die Bereiche apikal und basal eingeteilt und die zuvor durchgeführten allgemeinen Untersuchungen unter diesem Gesichtspunkt wiederholt.

3.3.1. Einfluss der Samenanlagenposition an der Plazenta auf ausgewählte Samenanlagenmerkmale

Zunächst wurde der Einfluss der Position der Samenanlagen an der Plazenta auf ausgewählte Samenanlagenparameter untersucht. Im Vordergrund standen hierbei zunächst Analysen zur Embryosackflächenheterogenität (d.h. Unterschiede in der Embryosackgröße).

3.3.1. 1. Embryosackheterogenität zu Anthesebeginn

Weder innerhalb noch zwischen den untersuchten diploiden Genotypen konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Embryosackflächenheterogenität in Abhängigkeit zur Samenanlagenposition an der Plazenta zu Anthesebeginn festgestellt werden. Bei der SK war die mittlere Heterogenität mit 16,6 % bei den apikalen Samenanlagen größer als bei den basalen Samenanlagen mit 13,4 % (Abb. 49). Bei den Genotypen SP und SS hingegen war die Heterogenität der apikalen Samenanlagen geringer als bei den basalen Samenanlagen. Die Unterschiede waren jedoch eher geringfügig und jedenfalls nicht signifikant.



Werteverteilung zu Abb. 49

Genotyp	cv in %	
	Position	
	Apikal	Basal
SK	16,6 a	13,4 a
SP	11,8 a	12,9 a
SS	13,6 a	15,1 a

Abb. 49. Embryosackflächen-Heterogenität zu Anthesebeginn in Abhängigkeit zur Samenanlagenposition an der Plazenta. Genotypenvergleich (n=jeweils 5 Pflanzen). Mittelwerte mit gleichen Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. $n_{SK} = 381$ Samenanlagen, $n_{SP} = 452$ Samenanlagen, $n_{SS} = 424$ Samenanlagen.

3.3.1. 2. Pollenschlauchwachstum in Abhängigkeit von der Position der Samenanlagen an der Plazenta

Fraglich war in diesem Zusammenhang auch, ob die Position der Samenanlagen an der Zentralplazenta einen Einfluss auf das Pollenschlauchwachstum und die Bestäubung der Samenanlagen ausübte. Dabei fiel auf, dass die Pollenschläuche nach dem Durchwachsen des Griffels zunächst die apikalen Samenanlagen erreichten und in diese auch zuerst einwuchsen (Tab. 16). Im basalen Bereich der Plazenta zeigte sich 4 Tage nach Bestäubung, dass deutlich weniger Pollenschläuche durchgewachsen und ebenfalls nur wenige Pollenschläuche bereits in Samenanlagen eingewachsen waren (Abb. 50). Im weiteren Verlauf erreichten dann allerdings mehr Pollenschläuche die basalen Samenanlagen und konnten daraufhin auch in sie einwachsen. Ebenfalls fiel auf, dass im basalen Bereich der Plazenta in manchen Proben, die Pollenschläuche zum Teil nur partiell an bestimmten Bereichen der Plazenta durchgewachsen waren, wohingegen in anderen Bereichen keine Pollenschläuche zu erkennen waren. Dennoch bleibt im Ergebnis festzuhalten, dass das Einwachsen der Pollenschläuche in die apikalen Samenanlagen zeitlich früher vonstatten ging als bei den basalen Samenanlagen. Die in Tabelle 16 gezeigten Ergebnisse stellen Mittelwerte dar. Die aufgeführte Abnahme der apikal ermittelten Pollenschläuche 6 Tage nach Bestäubung ist experimentell bedingt.

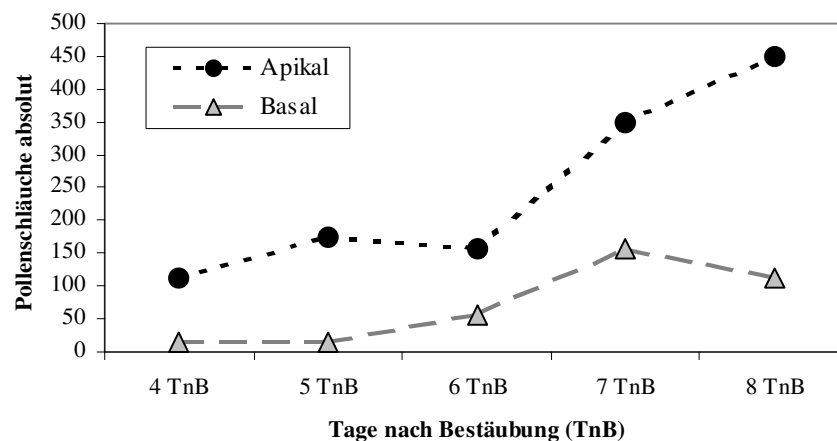


Abb. 50. Mittlere Anzahl Pollenschläuche in der Plazenta in Abhängigkeit von der Position der Samenanlagen beim Genotyp SP, $n_{\text{ges.}}$ 22 Plazenten.

Tab. 16. Einwachsen der Pollenschläuche in die Plazenta und die Samenanlagen 4-8 Tage nach der Bestäubung (TnB) in Abhängigkeit von der Samenanlagenposition. Mittlere Anzahl, PS absolut = Pollenschläuche, die die Plazenta erreichten, PS eingewachsen = Pollenschläuche, die tatsächlich in die Samenanlagen eingewachsen sind.

TnB	Apikal (mittlere Anzahl)			Basal (mittlere Anzahl)		
	PS absolut	PS eingewachsen		PS absolut	PS eingewachsen	
	Summe	Summe		Summe	Summe	
4 TnB	111	27	24,3	16	3	18,7
5 TnB	175	98	56	15	8	53,3
6 TnB	157	51	32,5	55	21	28,2
7 TnB	350	100	-	158	74	46,8
8 TnB	450	-	-	111	-	-

3.3.1. 3. Größe der Embryosackflächen und Größenzunahme nach induzierter Bestäubung

Eine wichtige Fragestellung war weiterhin, ob es in Abhängigkeit von der Position der Samenanlagen an der Plazenta Unterschiede bezüglich der absoluten Embryosackgröße gab. Die Untersuchungen an den Genotypen SK, SS und SP ergaben keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Embryosackfläche zu Anthesebeginn. Es bestand jedoch bei allen Genotypen die Tendenz, wonach die apikalen Embryosäcke größer waren, als die basalen (Abb. 51).

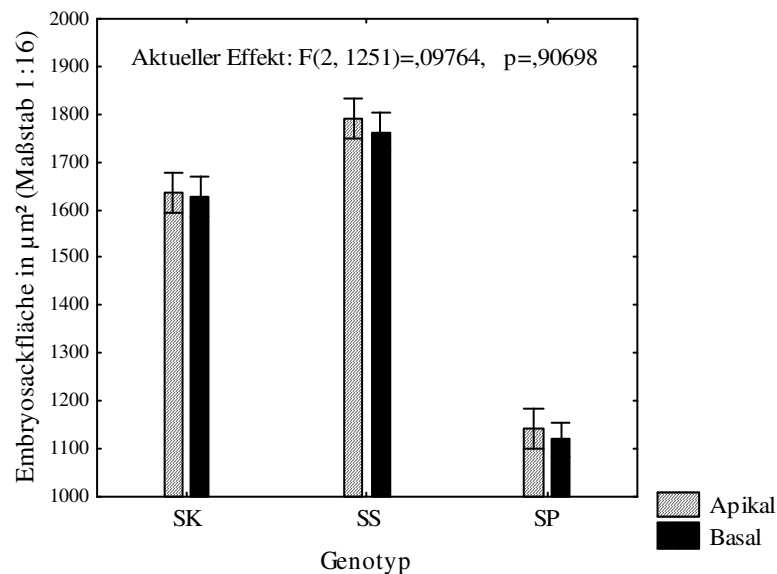


Abb. 51. Vergleich der Embryosackflächen in Abhängigkeit von der Position der Samenanlagen an der Plazenta zu Anthesebeginn. Genotypenvergleich. Vertikale Balken bedeuten 0, 95 Konfidenzintervalle. Maßstab 1:16 bedeutet, $1 \mu\text{m}^2 = 16 \mu\text{m}^2 = \text{Fläche} \times 16$. $n_{\text{SK}} = 381$ Samenanlagen, $n_{\text{SP}} = 452$ Samenanlagen, $n_{\text{SS}} = 424$ Samenanlagen.

Wertevertellung zu Abb. 51. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$).

Genotyp	Embryosackfläche in μm^2 (Maßstab 1:16)	
	Apikal	Basal
SK	1636,6 a	1626,0 a
SS	1790,9 b	1761,9 b
SP	1141,3 c	1120,4 c

Um auch auf der Ebene der Einzelpflanzen das Beobachtete bestätigen zu können, wurden diese Untersuchungen bei den diploiden Genotypen an verschiedenen Pflanzen durchgeführt. Auch zwischen den Einzelpflanzen wurden Unterschiede hinsichtlich der Embryosackgröße zu Anthesebeginn in Abhängigkeit zur Samenanlagenposition festgestellt. Die Unterschiede waren jedoch bei den Genotypen SP und SK zum Teil nicht signifikant. Beim Genotyp SS dagegen waren bei einigen Pflanzen die Unterschiede signifikant (Abb. 52).

Es war aber bereits zu diesem Zeitpunkt des Anthesebeginns bei allen diploiden Genotypen auch innerhalb der untersuchten Einzelpflanzen bereits eine Tendenz feststellbar, wonach die apikalen Samenanlagen größere Embryosäcke hatten als die basalen Samenanlagen.

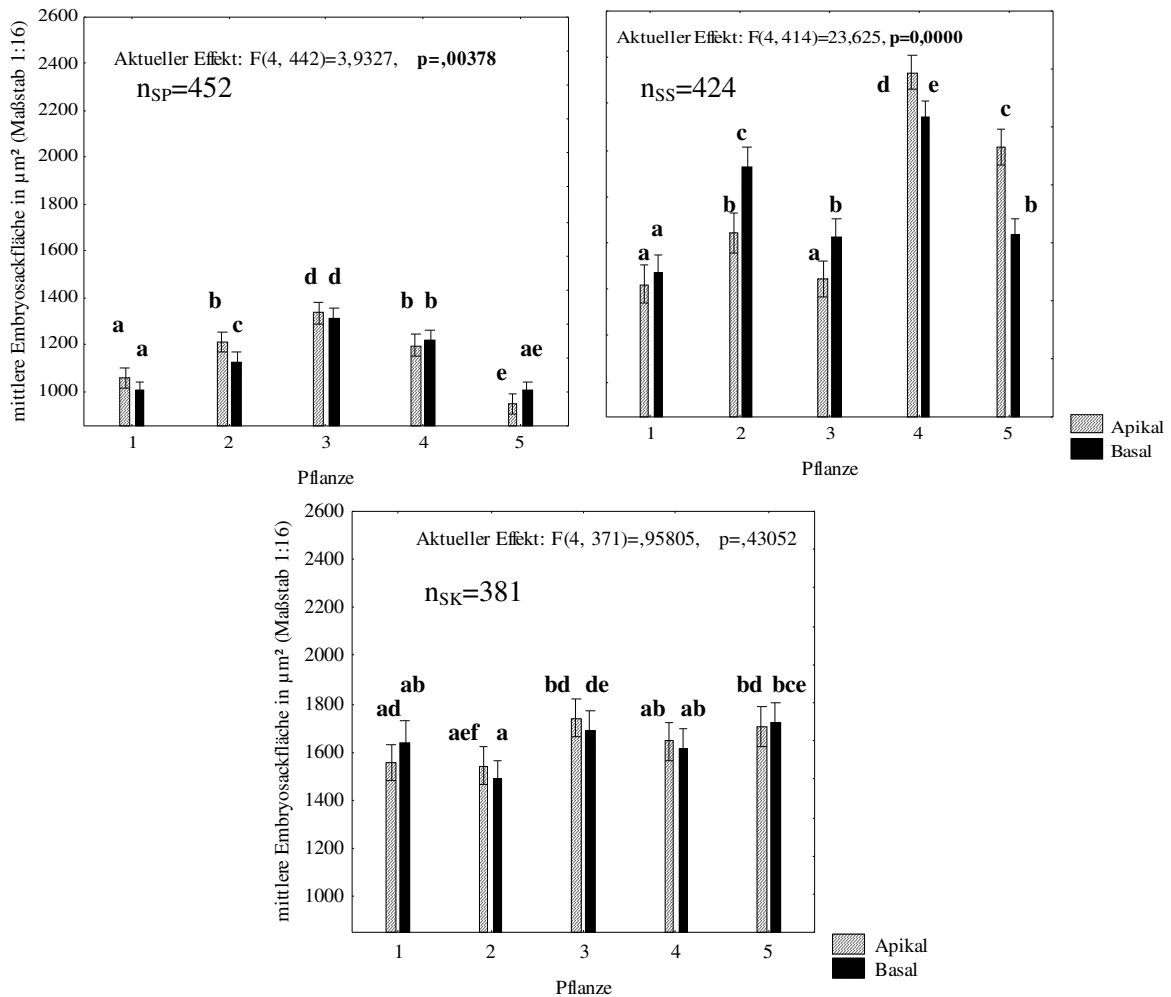


Abb. 52. Einzelpflanzenvergleich bezüglich der Fläche der Embryosäcke in Abhängigkeit von der Samenanlagenposition an der Plazenta zu Anthesebeginn (links oben) SP, (rechts oben) SS, (unten mitte) SK. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. Maßstab 1:16 bedeutet, $1 \mu\text{m}^2 = 16 \mu\text{m}^2 = \text{Fläche} \times 16$.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurden die Unterschiede bezüglich der Embryosackfläche in Abhängigkeit zur Samenanlagenposition noch deutlicher und signifikant. Bis auf wenige Ausnahmen konnte auch hier wiederum bei der Einzelpflanzenuntersuchung bestätigt werden, dass die apikalen Embryosäcke größer waren als die basalen Embryosäcke. Somit wurde im Ergebnis festgestellt, dass zu jedem Untersuchungszeitpunkt die apikalen Embryosäcke größer als die Basalen waren, wobei zu Anthesebeginn diese Unterschiede noch nicht so deutlich ausgeprägt waren, wie im weiteren Verlauf der Samenanlagenentwicklung (Abb. 53).

Es zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen, vergleichbar mit den Befunden zum Pollenschlauchwachstum, dass die apikalen Embryosäcke zeitlich früher, offenbar durch Endospermibildung, mit der Größenzunahme einsetzten als die basalen Embryosäcke.

Somit konnte festgestellt werden, dass sowohl die Befruchtung der Samenanlagen im apikalen Teil der Plazenta, als auch die Größenzunahme der Embryosäcke früher stattfand, als im basalen Teil der Plazenta.

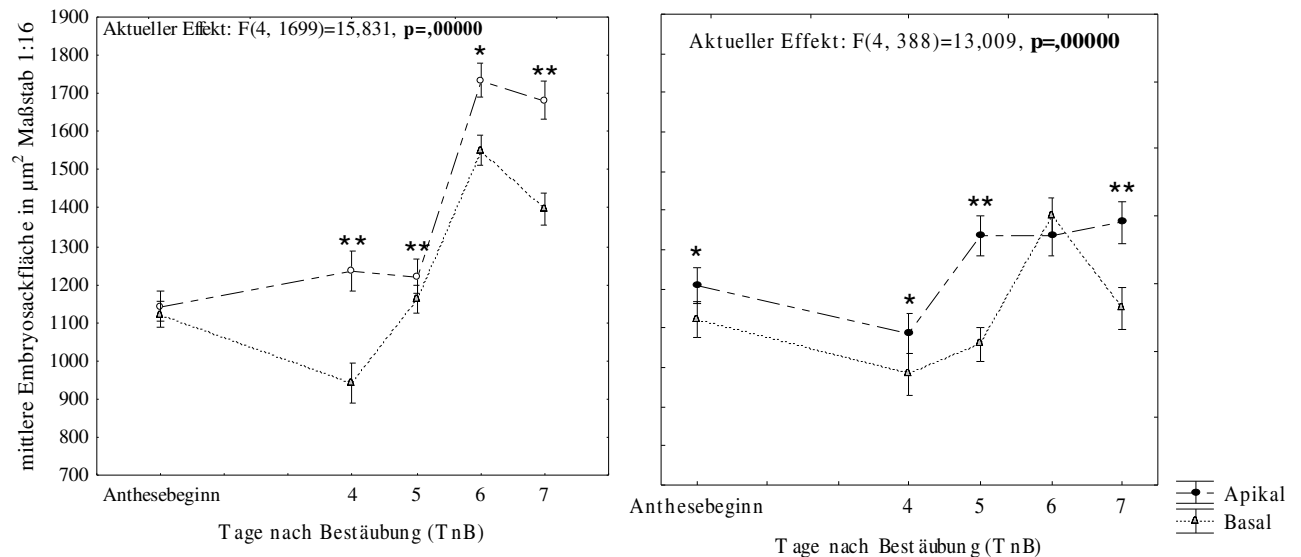


Abb. 53. Embryosackflächenvergrößerung nach induzierter Bestäubung bei SP allgemein (links) und am Beispiel einer ausgewählten Einzelpflanze von SP (rechts). Mit * und ** markierte Mittelwerte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Positionen in den jeweiligen Zeiträumen von Anthesebeginn bis 7 Tage nach Bestäubung, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Newman-Keuls-Test). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. Maßstab 1:16 bedeutet $1 \mu\text{m}^2 = 16 \mu\text{m}^2 = \text{Fläche} \times 16$. $n_{\text{ges.}} = 1709$.

Werteverteilung zu Abb. 53, Maßstab Embryosackflächen 1:16, TnB=Tage nach Bestäubung

Genotyp	Anthesebeginn				4 TnB				5 TnB			
	Apikal		Basal		Apikal		Basal		Apikal		Basal	
	Fläche	cv	Fläche	cv	Fläche	cv	Fläche	cv	Fläche	cv	Fläche	cv
SK	1636,5	17,2	1626	14,4								
SP	1141,3	16,7	1120,4	16,9	1235,4*	20,9	941,4*	26,7	1221,4	16,9	1161,3	18,4
SS	1790	24,6	1761,9	20,3								

Genotyp	6 TnB				7 TnB			
	Apikal		Basal		Apikal		Basal	
	Fläche	cv	Fläche	cv	Fläche	cv	Fläche	cv
SK								
SP	1734,5*	26,1	1550,9*	19,5	1682,5*	21,9	1397,7*	24,9
SS								

3.3.2. Samenentwicklung in Abhängigkeit zur Position an der Plazenta

Flowcytometrische Messungen während der Samenbildung von Genotyp SS in Abhängigkeit zur Samenanlagenposition zeigten ebenfalls Unterschiede (Abb. 54). Diese Unterschiede bestanden sowohl im Anteil des triploiden Endosperms, als auch im Anteil des hexaploiden Endosperms, also dem Anteil mit mitotischer Aktivität (Abb. 55). Diploide Anteile im Samen wurden hierbei wiederum nicht analysiert.

Bereits 32 Tage nach Bestäubung zeigten sich deutliche Unterschiede im Anteil des triploiden sowie hexaploiden Endosperms in Abhängigkeit von der Samenanlagenposition. Basale Samenanlagen hatten einen höheren Anteil von differenzierten und hexaploiden Endosperm mit mitotischer Aktivität. Diese Unterschiede konnten auch im weiteren Verlauf der Samenbildung festgestellt werden. Es fiel auf, dass bei den apikalen Samenanlagen die Endospermbildung bereits 49 Tage nach Bestäubung abnahm, bei den basalen Samenanlagen jedoch erst 56 Tage nach Anthesebeginn. Zum Abschluss der Untersuchungen 63 Tage nach Bestäubung unterschieden sich die Anteile des Endosperms in Samenanlagen beider Positionen nicht signifikant voneinander, jedoch zeigten auch zu diesem Zeitpunkt die basalen Samenanlagen eine höhere mitotische Aktivität, die Endospermbildung war bei ihnen demnach 63 Tage nach Anthesebeginn offensichtlich noch nicht abgeschlossen (Abb. 55).

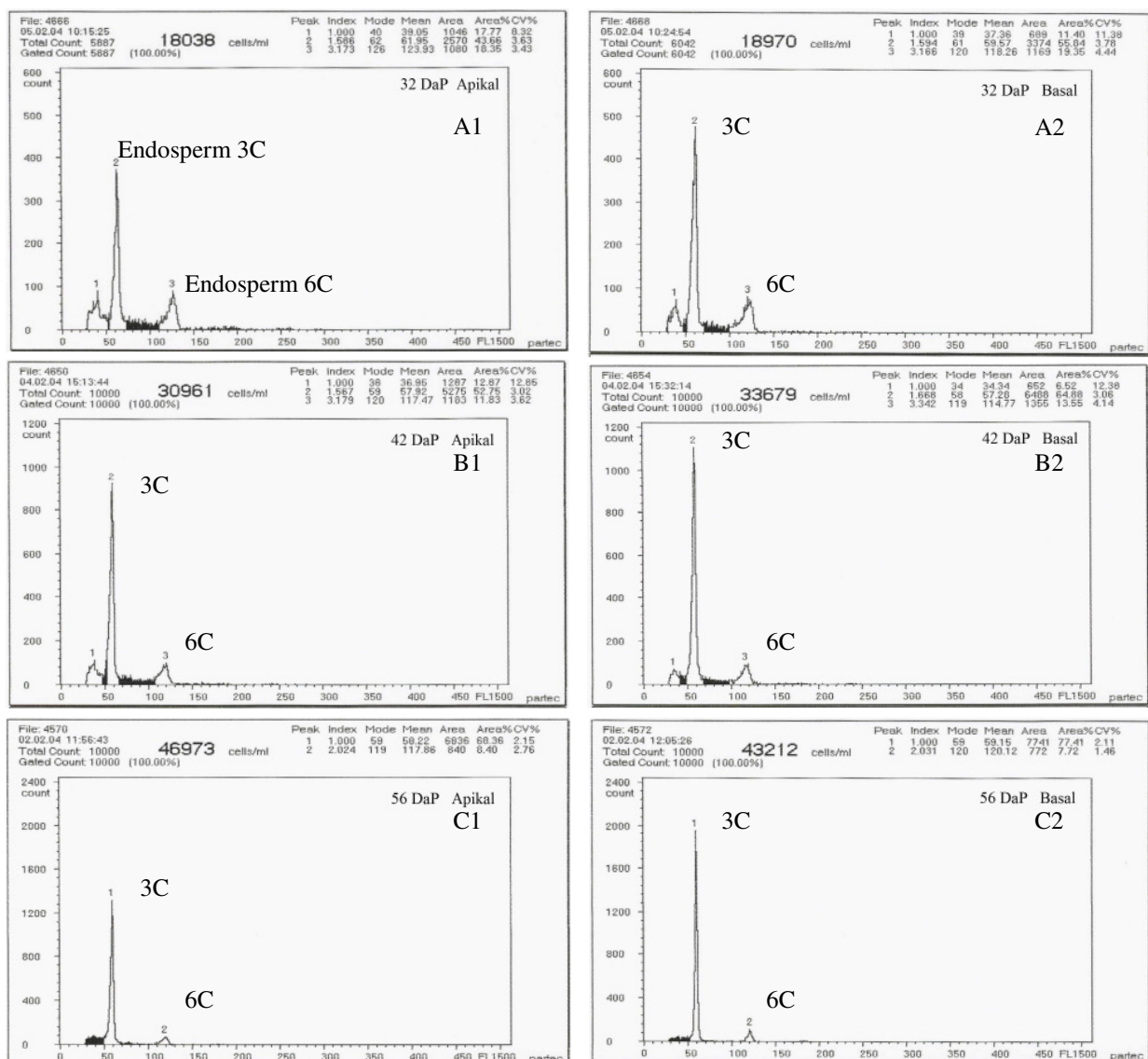


Abb. 54. Samenentwicklung in Abhängigkeit von der Position des Samens in der Kapsel zu verschiedenen Zeitpunkten. A1 und A2) 32 Tage nach Bestäubung, B1 und B2) 42 Tage nach Bestäubung, C1 und C2) 56 Tage nach Bestäubung. Flowcytometrische Untersuchung. DNA-Histogramme. Links Samen in apikaler Position, rechts Samen in basaler Position. Die X-Achse repräsentiert den relativen DNA-Gehalt, die Y-Achse repräsentiert die Anzahl Zellen, n = 10000 Zellen je Untersuchungszeitraum und Position.

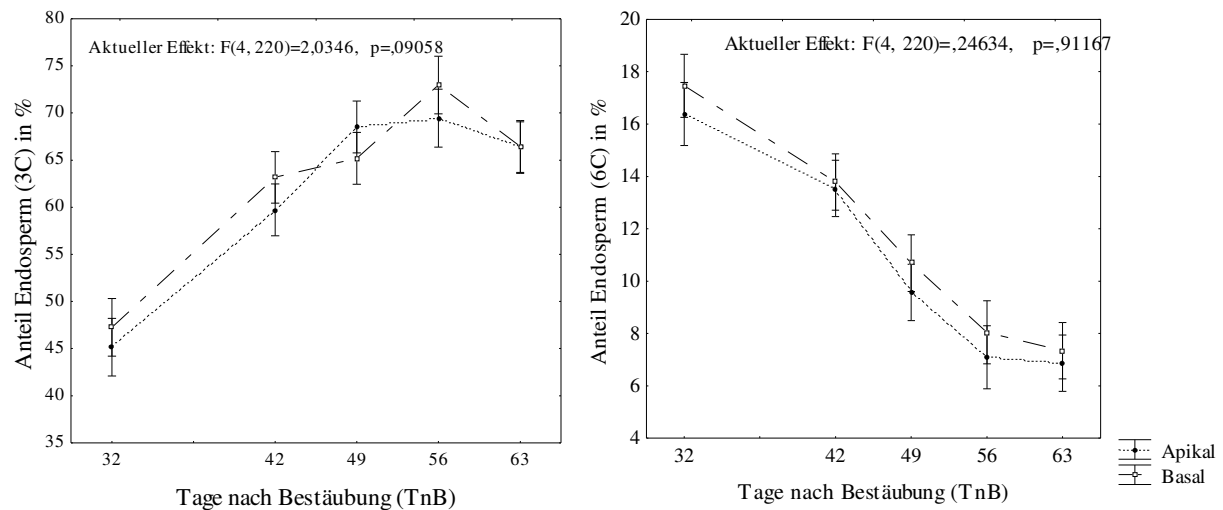
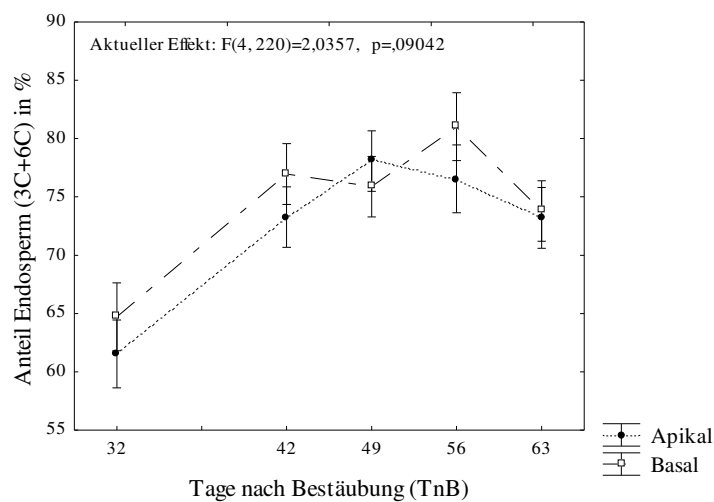


Abb. 55. Samenentwicklung in Abhängigkeit von der Samenposition in der Kapsel. Anteil Endosperm 3n in % (links) und 6n in % (rechts) und zusammenfassende Darstellung des Endosperms 3n+6n in % (unten), nach flowcytometrischer Analyse am Beispiels des Genotyps SS Varianzanalyse ($\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle.



Werteverteilung zu Abb. 55 (Teil 1)

Wh d	32 TnB				42 TnB						49 TnB							
	3C		6C		3C+6C		3C		6C		3C+6C		3C		6C		3C+6C	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1.	39,7	47,2	14,4	17,6	54,1	64,8	54,6	60,8	12	12,8	66,6	73,6	68,4	63,1	8,2	8,7	76,6	71,8
2.	47,2	48,7	17,1	18	64,3	66,7	63,5	63,3	13,1	12,6	76,6	75,9	71,7	71,3	8,8	8	80,5	79,3
3.	48,6	46,7	17,9	20,5	66,5	67,2	57,9	65,1	13,9	13	71,8	78,1	70,2	71,2	9,1	12,2	79,3	83,4
4.	45,1	46,4	16,2	13,7	61,3	60,1	66,2	71	11,5	13	77,7	84	69,1	61,5	8,9	10,6	78	72,1
Σ	45,1	47,3	16,4	17,5	61,5	64,8	60,5	65	12,6	12,9	73,1	77,9	69,9	66,8	8,8	9,9	78,7	76,7
Ges	46,2%		16,9%		63,1%		62,8%		12,7%		75,5%		68,3%		9,3%		77,6%	

3C = Endosperm, 6C = Mitoseaktivität, A=Apikal, B=Basal, TnB= Tage nach Bestäubung

Werteverteilung zu Abb. 55 (Teil 2)

Whd	56 TnB						63 TnB					
	3C		6C		3C+6C		3C		6C		3C+6C	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1.	67,7	66,1	8,3	8,6	76	74,7	71,5	67,4	5,4	6	76,9	73,4
2.	65,9	71,3	5,8	7,4	71,7	78,7	60,1	67,2	6,1	6,2	66,2	73,4
3.	69,8	76,9	6,4	7,9	76,2	84,8	69,1	70,2	9,4	8,1	78,5	78,3
4.	74,4	77,7	7,9	8,3	82,3	86	72,4	67,6	6,6	9,4	79	77
Σ	69,4	73	7,1	8	76,5	81	68,3	68,1	6,9	7,4	75,2	75,5
Ges.	71,2 %		7,6 %		78,8 %		68,2 %		7,1 %		75,3 %	

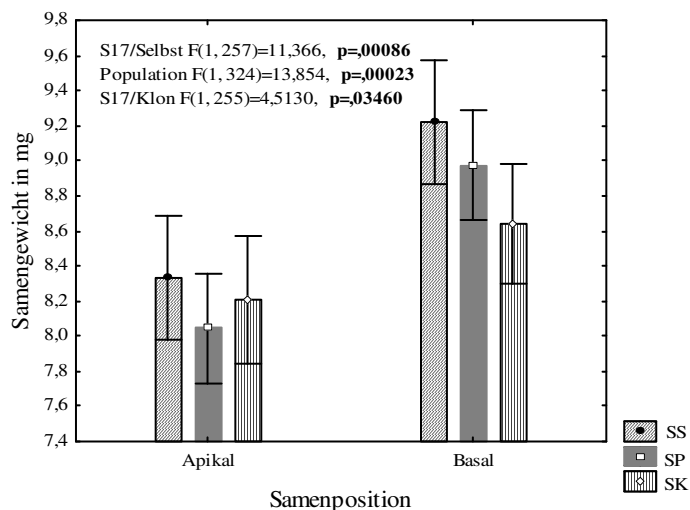
3C=Endosperm, 6C=Mitoseaktivität, A=Apikal, B=Basal, TnB = Tage nach Bestäubung

3.3.3. Positionseffekte auf die innere Qualität der Samen

Des Weiteren sollte festgestellt werden, inwieweit die Position des Samens einen Einfluss auf ausgewählte Samenqualitätsparameter ausübte.

3.3.3. 1. Samengewicht

Zunächst wurde festgestellt, dass bei allen Genotypen positionsabhängige Unterschiede im mittleren Samengewicht bestanden. Die basalen Samen einer Kapsel hatten im Vergleich zu den apikalen Samen ein signifikant höheres Gewicht (Abb. 56). Bei der Betrachtung der Einzelpflanzensamengewichte innerhalb der Genotypen konnte festgestellt werden, dass auch hier in allen untersuchten Fällen Unterschiede zwischen der basalen und der apikalen Samenposition existierten (Ergebnisse nicht dargestellt).



Werteverteilung zu Abb. 56

Genotyp	mittleres Einzelsamengewicht in mg	
	Apikal	Basal
SS	8,3	9,2
SP	8,0	9,0
SK	8,2	8,6

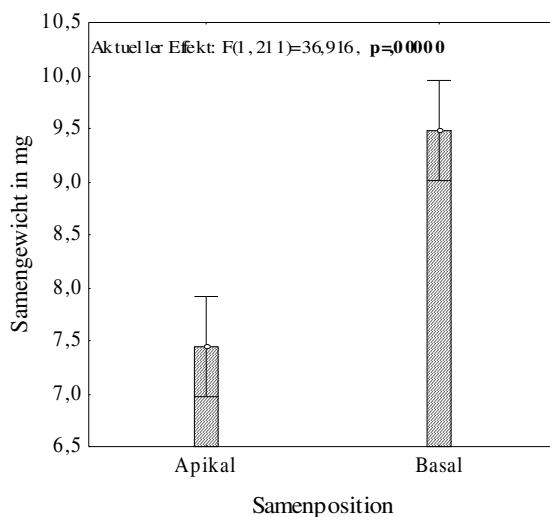
Abb. 56. Vergleich der diploiden Genotypen bezüglich des Samengewichts in Abhängigkeit von der Samenposition. Vertikale Balken bedeuten 0, 95 Konfidenzintervalle.

3.3.3. 2. Ausgewählte Sameninhaltsstoffe

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die bislang nachgewiesenen Positionsunterschiede auch in der inneren Qualität der Samen, also in Bezug auf die Sameninhaltsstoffe Kohlenhydrate, lösliche Proteine und Lipide, niederschlugen.

Kohlenhydratgehalt in Abhängigkeit zur Position der Samen in der Kapsel

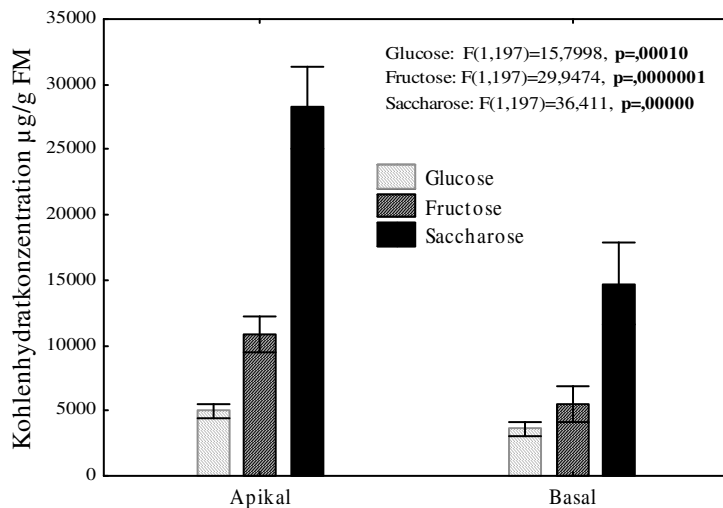
Die Analyse erfolgte in Abhängigkeit von der Position des Samens in der Kapsel. Auch hier wurde wiederum zwischen den Positionen apikal und basal unterschieden. Zunächst konnten auch bei dieser Untersuchung die zuvor beschriebenen signifikanten Unterschiede im Samengewicht bestätigt werden (Abb.57). Die apikalen Samen hatten ein mittleres Samengewicht von 7,4 mg, die Basalen von 9,5 mg. Die Unterschiede waren signifikant. Zunächst wurde auch hier wieder deutlich, dass der Gehalt an Saccharose im Samen deutlich höher war, als der Glucose- und der Fructosegehalt. Im Vergleich der reduzierten Zucker untereinander konnte wiederum gezeigt werden, dass die Fructose dominierte. Der Gehalt an Glucose war am geringsten. Es wurde weiterhin festgestellt, dass hinsichtlich des Kohlenhydratgehalts signifikante Unterschiede zwischen den Samenpositionen apikal und basal existierten (Abb.58). Demnach hatten die basalen Samen, sowohl bei den reduzierten Zuckern, als auch bei der Saccharose, im Vergleich zu den apikalen Samen einen deutlich geringeren Gehalt. Auch auf der Ebene der Einzelpflanzen innerhalb des Genotyps SS konnten die zuvor erkannten Positionsunterschiede bestätigt werden. (Abb.59).



Werte Verteilung zu Abb. 57

	mittleres Einzelsamengewicht in mg	
	Apikal	Basal
SS	7,4	9,5

Abb. 57. Ermittelte Samengewichte von SS in Abhängigkeit von der Position des Samens vor der Kohlenhydratanalyse. Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle.



Samenposition in der Kapsel

Werteverteilung zu Abb. 58

	Kohlenhydrate $\mu\text{g/g FM}$	
	Apikal	Basal
Glucose	4978,4	3602,1
Fructose	10879,7	5540
Saccharose	28273,5	14758,0

Abb. 58. Kohlenhydratgehalte bei SS in Abhängigkeit zur Samenposition. Vertikale Balken bedeuten 0, 95 Konfidenzintervalle. $n_{\text{apikal}} = 100$, $n_{\text{basal}} = 99$.

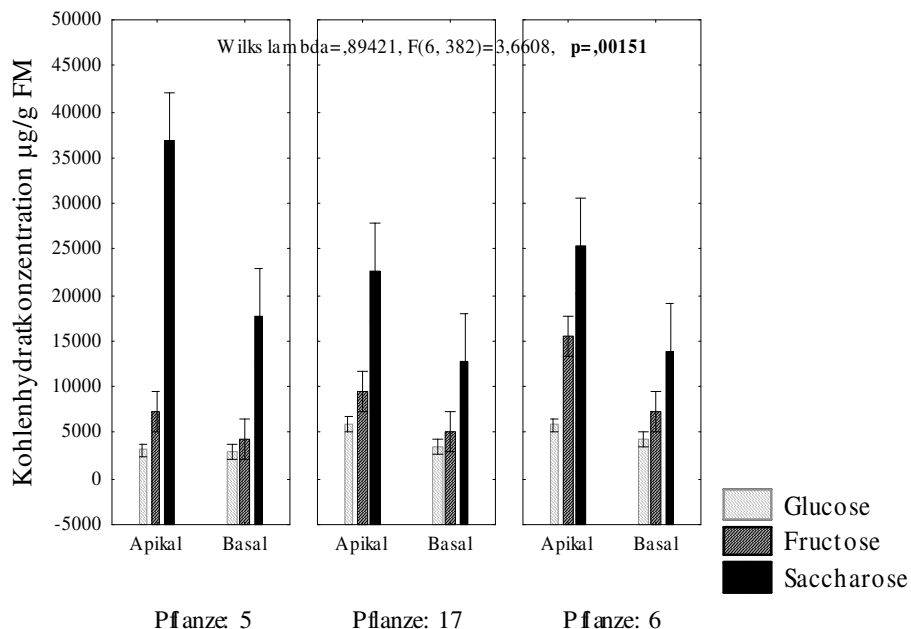


Abb. 59. Kohlenhydratgehalte in Einzelpflanzen von SS in Abhängigkeit von der Samenposition. Vertikale Balken bedeuten 0, 95 Konfidenzintervalle.

In Bezug auf die Kohlenhydratkonzentration in Abhängigkeit zum Alter der Kapsel und zur Position des Samens bestätigte sich auch hier wiederum das zuvor bereits Festgestellte. Danach stieg insbesondere die Konzentration der Saccharose mit zunehmendem Kapselalter (Abb. 60). Die Veränderungen bezüglich der Glucose- und Fructosekonzentration waren nicht signifikant (Tab. 17).

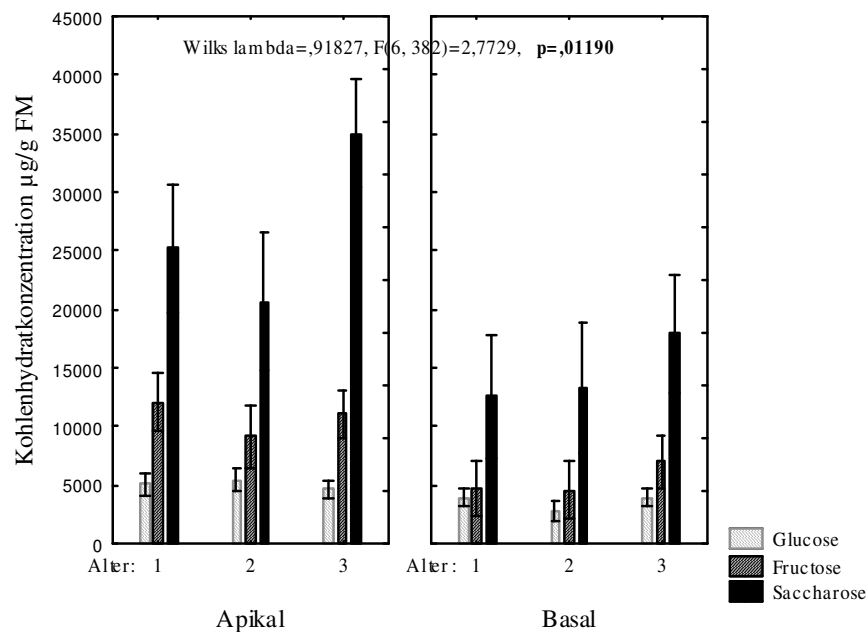


Abb. 60.

Kohlenhydratkonzentrationen mit zunehmendem Alter der Kapsel in Abhängigkeit von der Samenposition. Vertikale Balken bedeuten 0, 95 Konfidenzintervalle. Das angegebene Alter der Kapseln bezieht sich auf die Bestäubungsreihenfolge der Blüten, ↑Pkt. 2.2.1, Tab. 4.

Tab. 17. Kohlenhydratgehalte im Samen von SS in Abhängigkeit vom Alter der Kapsel und Samenposition. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte innerhalb der Zeilen (Kohlenhydrat) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$).

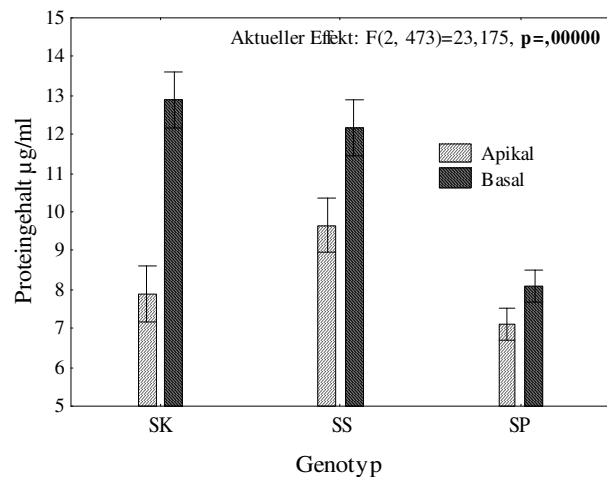
	Alter 1		Alter 2		Alter 3	
	Kohlenhydrate $\mu\text{g/g FM}$		Kohlenhydrate $\mu\text{g/g FM}$		Kohlenhydrate $\mu\text{g/g FM}$	
	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal
Glucose	5046,9 a	3957,1 ac	5451,6 a	2797,8 bc	4644,4 a	3937,7 ac
Fructose	12100,8 (a)	4689,4 (b)	9180,3 (ac)	4619,4 (b)	11055,4 (a)	7045,2 (bc)
Saccharose	25255,9 [a]	12563,9 [c]	20645,2 [ac]	13275,2 [c]	34991,1 [b]	17917,3 [ac]

Konzentration löslicher Speicherproteine im Samen in Abhängigkeit von der Samenposition

A) Biochemische Analyse

Aufgrund der Erkenntnisse aus dem Vorversuch wurden aus den Genotypen SS, SP und SK weitere Samen in Abhängigkeit von der Samenposition in der Kapsel analysiert. Diesmal erfolgte die Samenpräparation und Probenaufbereitung nach der Heißwassermethode (55 °C, 10 Minuten). Bei den Genotypen SK und SS konnten signifikante Unterschiede im Gehalt löslicher Proteine im Vergleich der beiden Positionen apikal und basal festgestellt werden.

Beim Genotyp SP waren diese Unterschiede nicht signifikant, aber dennoch im Mittel deutlich. Die basalen Samen zeigten einen deutlich höheren Gehalt an löslichen Proteinen als die apikalen Samen (Abb. 61).



Werteverteilung zu Abb. 61

Genotyp	Proteine µg/ml	
	Apikal	Basal
SK	7,9 a	12,9 b
SS	9,7 c	12,2 b
SP	7,1 a	8,1 a

Abb. 61. Genotypenvergleich bezüglich des Gehalts löslicher Proteine in Abhängigkeit von der Position des Samens. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. $n = 50$ Samen je Genotyp und Position.

Auch bei der Untersuchung verschiedener Einzelpflanzen in allen drei Genotypen zeigte sich bei allen Pflanzen der gleiche Positionseffekt und darüber hinaus auch, dass die Differenz im Proteingehalt zwischen den beiden Positionen apikal und basal stark schwankte. So kamen Pflanzen vor, bei denen es große Differenzen zwischen den beiden Positionen gab und wiederum andere, bei denen der Unterschied eher gering ausfiel (Abb. 62). Deutliche Positionseffekte waren bei den Genotypen SK und SS vorhanden. Bei der SP war die Unterschiede zwischen den Positionen nicht so deutlich ausgeprägt.

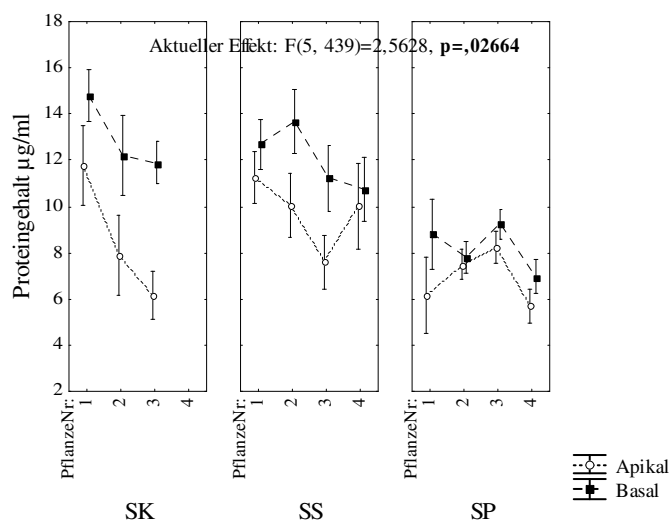
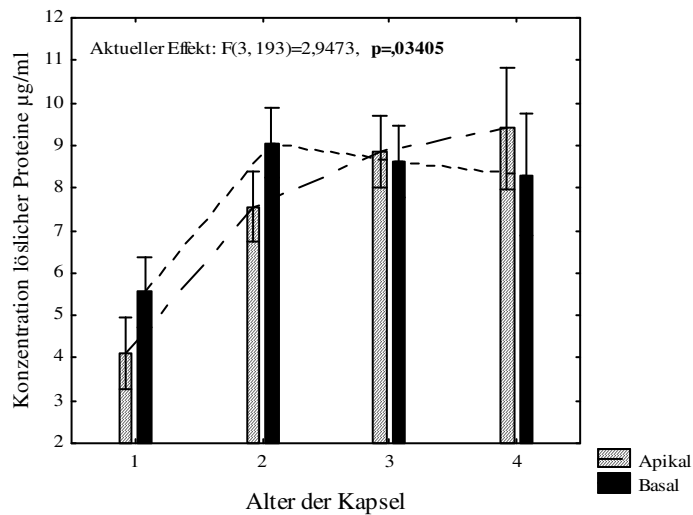


Abb. 62. Einzelpflanzenuntersuchung innerhalb der diploiden Genotypen bezüglich der Konzentration löslicher Proteine in Abhängigkeit zur Samenposition. Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. $n = 4$ Pflanzen.

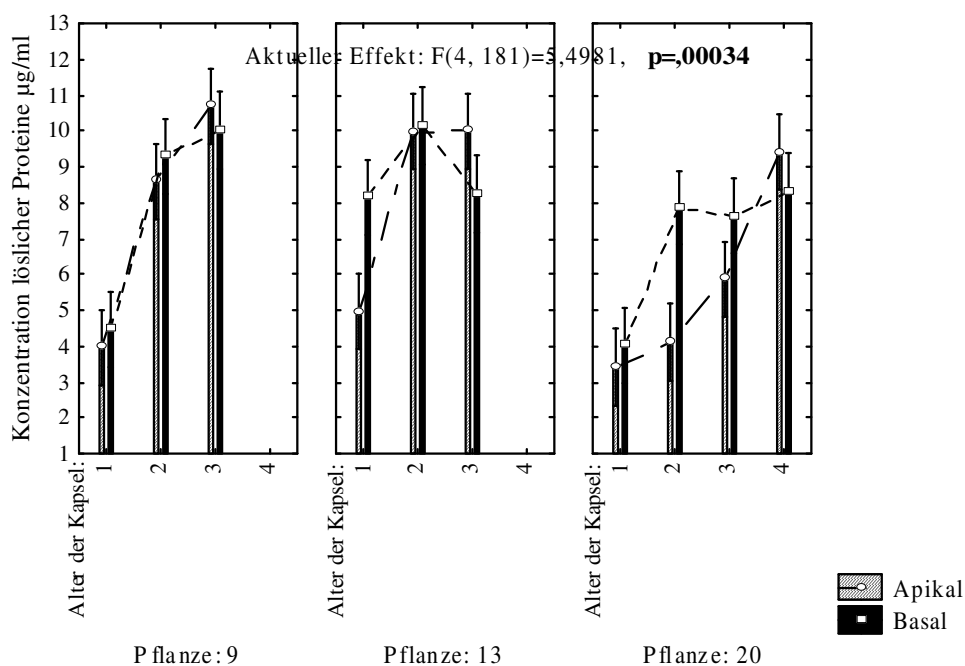
Weiterhin konnte erkannt werden, dass der eben erwähnte Positionseffekt bei älteren Kapseln in der Form nicht mehr auftrat. Zum Teil war bei ihnen sogar in der apikalen Position der Proteingehalt höher als in der basalen Position (Abb. 63).



Werteverteilung zu Abb. 63, oben

Alter der Kapsel	Proteinkonzentration µg/ml	
	Apikal	Basal
1	4,1 a	5,6 b
2	7,6 c	9,1 c
3	8,9 c	8,6 c
4	9,4 c	8,3 c

Abb. 63. Veränderung des Proteingehalts mit zunehmendem Kapselalter in Abhängigkeit von der Position des Samens bei SP generell (oben) und innerhalb ausgewählter Einzelpflanzen (unten). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. Das angegebene Alter der Kapseln bezieht sich auf die Bestäubungsreihenfolge der Blüten, ↑Pkt. 2.2.1, Tab. 4.



Werteverteilung zu Abb. 63, unten

Alter der Kapsel	Konzentration löslicher Proteine µg/ml					
	Pflanze 9		Pflanze 13		Pflanze 20	
	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal
1	4,0	4,5	5,0	8,2	3,4	4,0
2	8,6	9,3	10,0	10,1	4,1	7,8
3	10,7	10,0	10,0	8,2	5,9	7,6
4					9,4	8,3

B) Mikroskopische Analyse

Weiterhin sollte geklärt werden, inwieweit es mit mikroskopischen Analysen ebenfalls möglich ist, die zuvor erkannten Positionseffekte, bezüglich der Konzentration der Speicherproteine zu bestätigen. Dazu wurde in einem definierten Bereich mittels Bildbearbeitungsprogramm die Dichte der detektierten Proteinpartikel ermittelt. Es zeigte sich auch hier wieder das vorher schon beschriebene Phänomen, wonach in den basalen Samen eine deutlich höhere Proteinkonzentration zu finden war, als in den Apikalen. Dies konnte an zwei in die Untersuchung einbezogenen Genotypen bestätigt werden. Dabei zeigten sich bei der SP signifikante Positionsunterschiede. Bei der SS waren diese im Mittel ebenfalls sehr deutlich ausgeprägt, aber nicht signifikant (Abb. 64).

Wertevertellung zu Abb. 64. Anzahl = Anzahl der Proteinpartikel, T.O.A. (Total object area) = Gesamtfläche der Proteinpartikel in μm^2 , R.O.A. (Relative object area) = Dichte der Proteinpartikel in %, A.O.A. (Average object area) durchschnittliche Fläche der einzelnen Proteinpartikel in μm^2 .

Genotyp/Pflanze	Position	Anzahl Partikel	p-Wert	T.O.A.	p-Wert	R.O.A.	p-Wert	A.O.A.	p-Wert
SP P13	Apikal	87	0,0045	4420,6	0,0074	8,9	0,007	52,18	0,635
SP P13	Basal	127		6307,9		12,7		50,08	
SS S4	Apikal	67	0,089	6028,55	0,054	12,14	0,054	90,65	0,436
SS S4	Basal	89		8219,05		16,55		102,93	

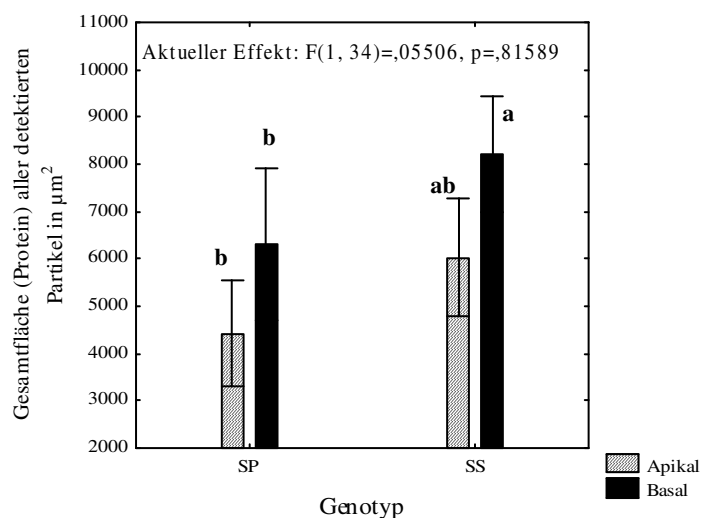


Abb. 64. Vergleich der Genotypen SP und SS bezüglich Proteinkonzentration im Endosperm reifer Samen (nach mikroskopischer Analyse) in Abhängigkeit von der Samenposition. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. n = 1 Kapsel je Genotyp mit 3 Wiederholungen.

Lipidkonzentration im Endosperm

Auch hier stand die Frage im Vordergrund, ob es bezüglich der Lipidkonzentration ebenfalls Positionsunterschiede zwischen den basalen und den apikalen Samen gab. Dazu wurde wiederum die zuvor bereits beschriebene mikroskopische Inhaltsstoffanalyse durchgeführt.

Es bestand eine deutliche Tendenz, dass die basalen Samen im Gegensatz zu den Apikalen auch hier im Lipidgehalt eine deutlich höhere Konzentration aufwiesen. Die Ergebnisse unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (Abb. 65).

Werteverteilung zu Abb. 65. Anzahl=Anzahl der Lipidpartikel, T.O.A. (Total object area) = Gesamtfläche aller detektierten Lipidpartikel in μm^2 , R.O.A. (Relative object area)=Dichte der Lipidpartikel in %, A.O.A. (Average object area) =durchschnittliche Fläche der einzelnen Lipidpartikel in μm^2 .

Genotyp/Pflanze	Position	Anzahl Partikel	p-Wert	T.O.A.	p-Wert	A.O.A.	p-Wert	R.O.A.	p-Wert
SP P13	Apikal	133	0,52	7561,68	0,22	58,5	0,124	15,23	0,22
SP P13	Basal	123		8687,06		74,9		17,49	

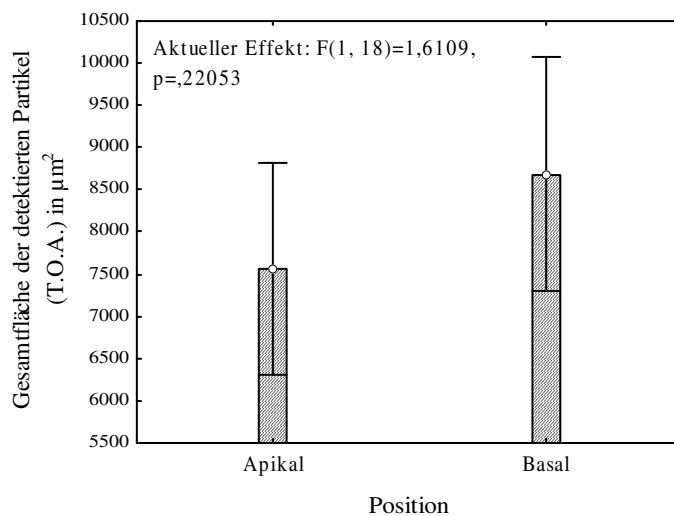


Abb. 65. Lipidkonzentration im Endosperm reifer Samen von SP (nach mikroskopischer Analyse) in Abhängigkeit von der Samenposition. Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. n= 1 Kapsel mit 3 Wiederholungen.

3.3.4. Einfluss der Samenposition in der Kapsel auf die Samenqualitätsparameter Keimfähigkeit und Triebkraft

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte festgestellt werden, inwieweit die Samenposition in der Samenkapsel einen nachweisbaren Einfluss auf den Anteil normaler Keimlinge und die Triebkraft der Keimlinge ausübte. Des Weiteren sollten somit mögliche Beziehungen zwischen den zuvor ermittelten Positionseffekten hinsichtlich der Samenanlagenmerkmale sowie der Sameninhaltsstoffe mit der Keimfähigkeit und Triebkraft des Saatgutes ermittelt werden.

3.3.4. 1. Keimfähigkeit in Abhängigkeit zur Samenposition

In Anbetracht der Ergebnisse zur Samenanlagenentwicklung und Differenzierung sowie der inneren Qualität reifer Samen, wurden die Keimversuche ebenfalls unter besonderer Berücksichtigung der Samenposition in der Kapsel durchgeführt. Zunächst wurden jedoch vergleichende Untersuchungen zur Keimfähigkeit der einzelnen Genotypen durchgeführt. Die Keimversuche wurden auf verschiedenen Keimunterlagen durchgeführt.

Keimversuch in Kunststoffpetrischalen

Die Anlage dieses Versuches diene als Vorversuch.

Die Ergebnisse aus diesem Versuch zeigten einen deutlichen Positionseffekt bei allen untersuchten Genotypen. Danach keimten die basalen Samen besser als die apikalen (Abb. 66, 67).

Keimversuch in Glaspetrischalen

Die Ergebnisse aus dem Vorversuch konnten im darauf folgenden Keimversuch mit 4x50 Samen bestätigt werden. Hier wurden allerdings nur die diploiden Genotypen untersucht, aufgrund der unzureichenden Anzahl geernteter Samen bei TK. Auch hier zeigten sich die eben erwähnten Effekte. So keimten die basalen Samen im Gegensatz zu den apikalen Samen besser. Im Falle der SP waren diese Unterschiede sogar stark signifikant ($p \leq 0,001$). Die Keimfähigkeit der basalen Samen war hier um 12 % höher als die der apikalen Samen. Bei den Genotypen SK und SS waren diese Unterschiede nicht signifikant, aber es war eine deutliche Tendenz zu beobachten.

Bei der Betrachtung des Keimungsverlaufs der Samen in Abhängigkeit von Genotyp und Samenposition konnte im Rahmen des Keimversuchs in Kunststoffpetrischalen festgestellt werden, dass die apikalen Samen zum Teil schneller keimten als die basalen. Besonders 21 Tage nach Auflegen der Samen waren diese Unterschiede noch sehr deutlich zu erkennen. Aber bereits 28 Tage nach Auflegen war der Anteil normaler Keimlinge bei den basalen Samen deutlich höher als bei den Apikalen, sodass zum Abschluss des Keimversuchs nach 35 Tagen die eben erwähnten Effekte eintraten, wonach die basalen Samen eine höhere Keimrate aufwiesen als die apikalen Samen (Ergebnisse nicht dargestellt). Das eben Beschriebene konnte in diesem Keimversuch in Glaspetrischalen in dieser Form nicht bestätigt werden. Lediglich die SS zeigte hier die gleichen Effekte wie im Keimversuch in Kunststoffpetrischalen. Im Ergebnis keimten aber auch hier letztlich die basalen Samen deutlich besser als die Apikalen (Abb. 66, 67, 69).



Abb. 66. Keimversuche in Glaspetrischalen, Bsp. SS, apikale Samen mit verminderter Keimfähigkeit (links) und basale Samen mit deutlich besserer Keimfähigkeit (rechts).

Keimfähigkeit auf Substrat

Im Anschluss an die zuvor durchgeführten Keimversuche in Petrischalen wurde zusätzlich noch ein Keimversuch auf Vermehrungssubstrat für *Cyclamen* durchgeführt. Hierbei wurden von den Genotypen SK, SS und SP jeweils insgesamt 2 mal 50 Samen in Abhängigkeit von der Samenposition apikal und basal aufgelegt. Die Sterilisation der Samen erfolgte durch Heißwasserextraktion im Rahmen der Analyse löslicher Proteine in der zuvor bereits beschriebenen Form. Auch bei diesem Keimversuch konnten die Ergebnisse aus den anderen beiden Versuchen bestätigt werden. Die beschriebenen Positionseffekte traten auch hier wiederum sehr deutlich auf (Abb. 67,70).

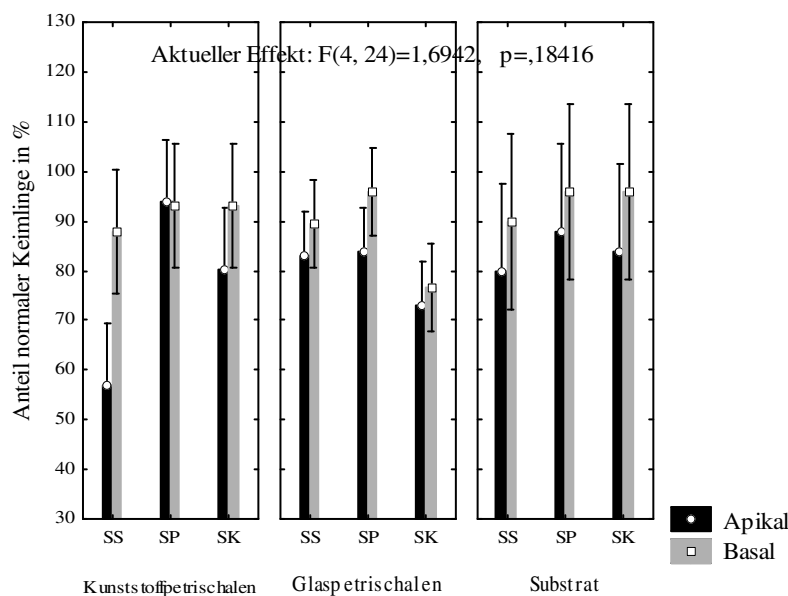


Abb. 67. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus allen Keimversuchen (Variante A = Kunststoffpetrischalen, B = Glaspetrischalen, C = Substrat) aller diploiden Genotypen mit besonderer Berücksichtigung der Samenposition. Vertikale Balken bedeuten 0, 95 Konfidenzintervalle.

Entwicklungsstörungen der Samen

Weiterhin wurden im Verlauf der Keimfähigkeitsprüfung der Anteil Samen erfasst, welcher gar nicht oder nur unvollständig keimte. Dieser wurde bei allen Keimungsversuchen auf den verschiedenen Nährmedien erfasst. Hierbei fiel wiederum auf, dass innerhalb jedes diploiden Genotyps die apikalen Samen einen deutlich höheren Anteil an unvollständig gekeimten, aber auch ungekeimten Samen besaßen. Der prozentuale Anteil der Samen mit Entwicklungsstörungen war bei den basalen Samen deutlich niedriger (Abb. 68, 69, 70). Im Falle des Genotyps SP waren die Unterschiede signifikant ($p \leq 0,01$). Bei den Genotypen SK und SS waren die Unterschiede nicht signifikant, aber die Tendenz war dennoch deutlich zu erkennen. Bezüglich der Entwicklungsstörungen der Samen im Vergleich der Genotypen untereinander ließ sich feststellen, dass die SP einen deutlich geringeren Anteil an unvollständig gekeimten Samen aufwies als die Genotypen SS und SK. Dies konnte auf allen drei Keimunterlagen festgestellt werden.

Samenbefall mit Pathogenen während der Keimung

Es zeigte sich im Verlauf der Keimfähigkeitsprüfung in den Petrischalen ein zunehmender Befall mit Mikroorganismen. Dabei wurde zwischen Pilzbefall und bakteriellem Befall der Samen unterschieden. Eine Identifizierung der Pathogene wurde nicht durchgeführt. Es fiel auf, dass vor allem die apikalen Samen betroffen waren. Die basalen Samen waren dagegen deutlich geringer befallen. Die Unterschiede waren deutlich, jedoch nicht signifikant. Die Kontamination des Saatgutes zeigte sich sowohl in Glas- als auch in Kunststoffpetrischalen (Abb. 68, 69). Die Befallsrate in den Kunststoffpetrischalen war höher als in den Glaspetrischalen. Bei den Keimfähigkeitstests auf Substrat konnte dagegen rein optisch keinerlei Kontamination mit Pilzen oder Bakterien festgestellt werden (Abb. 70).

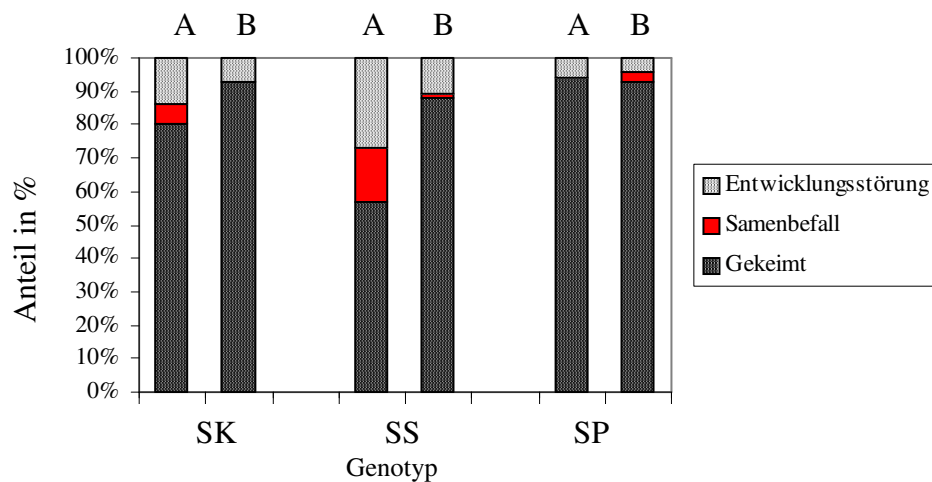


Abb. 68. Keimprüfung in Kunststoffpetrischalen in Abhängigkeit von der Samenposition diploider Genotypen. Entwicklungsstörungen und Saatgutkontamination der Keimlinge wurden mitberücksichtigt, A = apikal, B = basal, n = 2x50 Samen je Genotyp und Position.

Werteverteilung zu Abb. 68

Genotyp	Keimfähigkeitsprüfungen									
	Anteil normaler Keimlinge in %		Entwicklungsstörungen %				Saatgutbefall %			
			unvollständig gekeimt		ungekeimt		Bakterien		Pilze	
	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal
SK	80*	93*	12,8	3	1,2	4	0	0	6*	0*
SS	57	88	21	6	6	5	6*	0*	10	1
SP	94	93	1	4	5	0	0	0	0	3

Fett = sign $p \leq 0,05$; fett*: sign $p \leq 0,01$

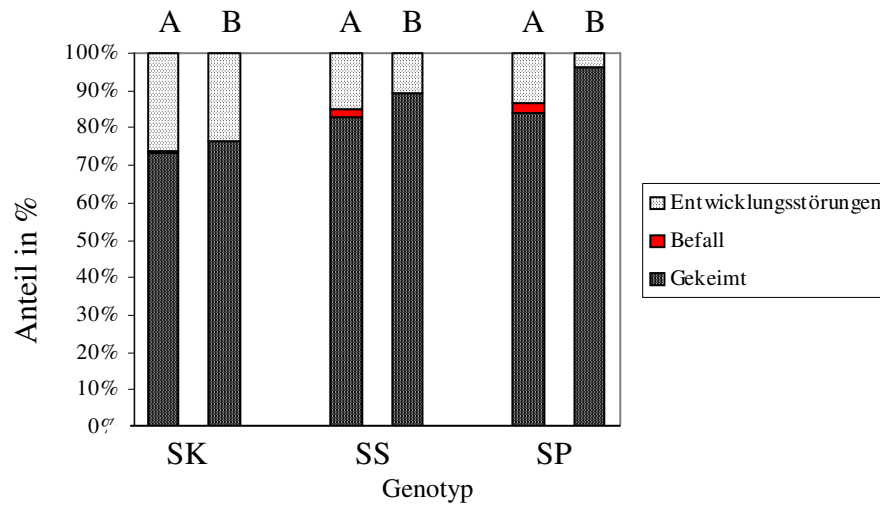


Abb. 69. Keimprüfung in Glaspetrischalen in Abhängigkeit von der Samenposition diploider Genotypen. Entwicklungsstörungen und Saatgutkontamination der Keimlinge wurden mitberücksichtigt, A = apikal, B = basal, n = 2x50 Samen je Genotyp und Position.

Verteilung zu Abb. 69

Genotyp	Keimfähigkeitsprüfungen									
	Anteil normaler Keimlinge in %		Entwicklungsstörungen %				Saatgutbefall %			
			unvollständig gekeimt		ungekeimt		Bakterien		Pilze	
	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal
SK	73	76,5	20,5	19,5	5,5	4	1	0	0	0
SS	83	89,5	10,5	7	4,5	3,5	1,5	0	0,5	0
SP	84*	96*	5,5	4	8	0	2,5	0	0	0

Fett= sign p<0, 05; fett*: sign p<0, 01

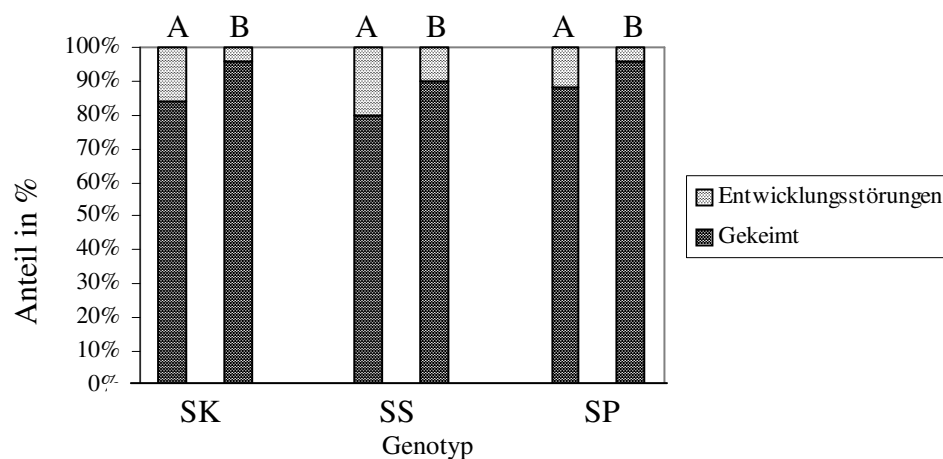


Abb. 70. Keimprüfung auf Substrat in Abhängigkeit von der Samenposition. Alle diploiden Genotypen sind dargestellt. Entwicklungsstörungen wurden mitberücksichtigt, A = apikal, B = basal, n = 50 Samen je Genotyp und Position.

Werteverteilung zu Abb. 70

Genotyp	Keimfähigkeitsprüfungen									
	Anteil normaler Keimlinge in %		Entwicklungsstörungen %				Saatgutbefall %			
			unvollständig gekeimt		ungekeimt		Bakterien		Pilze	
	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal	Apikal	Basal
SK	84	96	2	0	14	4	0	0	0	0
SS	80	90	2	4	18	6	0	0	0	0
SP	88	96	4	2	8	2	0	0	0	0

3.3.4. 2. Triebkraft der Keimlinge in Abhängigkeit zur Samenposition in der Kapsel

Bei den Keimversuchen in den Petrischalen (Glas, Kunststoff) wurde die Triebkraft der Keimlinge durch Auswiegen des gesamten Keimlings bestimmt. In beiden Varianten und bei allen Genotypen wurde eine höhere Triebkraft der basalen Keimlinge im Gegensatz zu den apikalen Keimlingen festgestellt (Abb. 71). Jedoch waren die Positionsunterschiede in der Glaspetrischalenvariante bei allen Genotypen nicht signifikant. In den Kunststoffpetrischalen konnten hingegen bei den Genotypen SP und SS signifikante Unterschiede zwischen den beiden Positionen festgestellt werden.

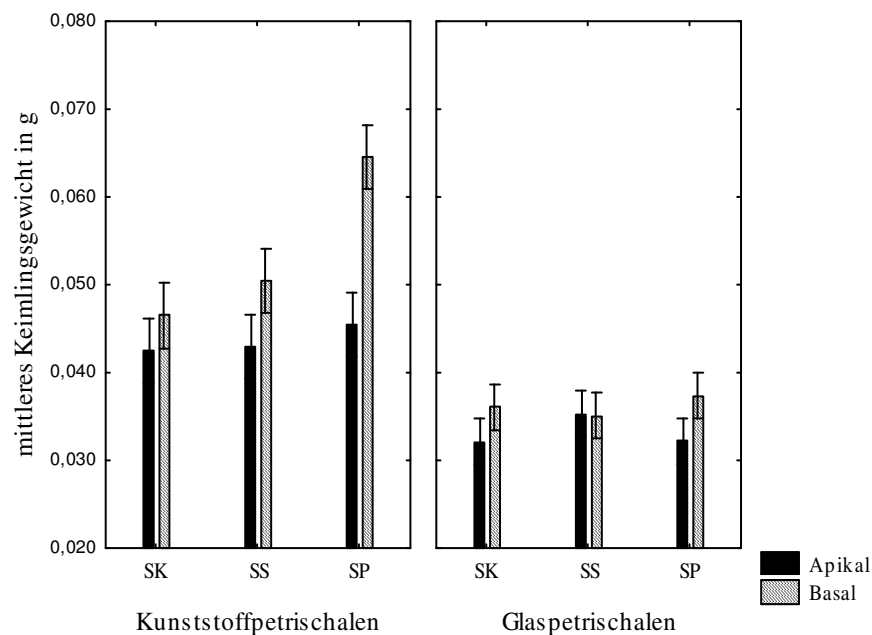


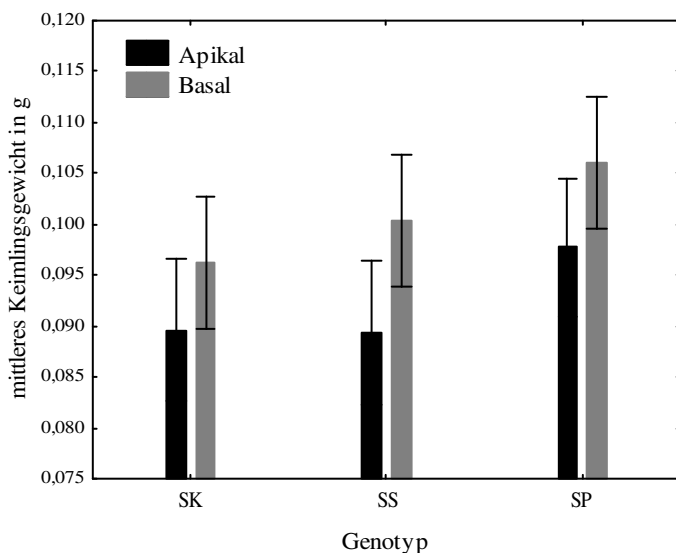
Abb. 71. Darstellung der mittleren Keimlingsgewichte als Maß für die Triebkraft aller diploiden Genotypen aus den Keimungsversuchen in Petrischalen (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. $n_{\text{Kunststoff}} = 100$ Samen je Genotyp und Position, $n_{\text{Glas}} = 100$ Samen je Genotyp und Position.

Werteverteilung zu Abb. 71

Genotyp	Kunststoffpetrischalen		Glaspetrischalen	
	Apikal	Basal	Apikal	Basal
SK	0,0425 a	0,0465 ab	0,0321 a	0,0361 a
SS	0,0430 a	0,0505 b	0,0353 a	0,0351 a
SP	0,0455 ab	0,0645 c	0,0322 a	0,0373 a

Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte innerhalb der Keimungsvarianten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Des Weiteren wurde die Triebkraft auf Vermehrungssubstrat bestimmt. Die bei den zuvor durchgeführten Triebkrafttests in Petrischalen zu beobachtenden Positionsunterschiede waren hier noch deutlicher ausgeprägt und konnten somit bestätigt werden. Die Keimlinge waren im Mittel bei allen untersuchten Genotypen bei den basalen Samen schwerer als bei den Apikalen (Abb. 72).



Werteverteilung zu Abb. 72

Genotyp	mittleres Keimlingsgewicht in g	
	Apikal	Basal
SK	0,0896 a	0,0962 a
SS	0,0894 a	0,100 ab
SP	0,0977 ab	0,106 b

Abb. 72. Darstellung der mittleren Keimlingsgewichte aller diploiden Genotypen aus dem Keimungsversuch auf Substrat. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte innerhalb der Keimungsvarianten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha = 0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. n = 50 Samen je Genotyp und Position.

Besonders bezüglich der Länge und des Gewicht des Hypokotyls bzw. des Hypokotyls unter Berücksichtigung der Keimwurzeln konnten bei den Genotypen SS und SK signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$) festgestellt werden (Abb. 73). Danach war das Hypokotyl bei den basalen Samen deutlich schwerer und länger als bei den apikalen Samen (Tab. 18). Beim Genotyp SP waren die Unterschiede zwar deutlich, aber nicht signifikant. Die ermittelten Effekte traten innerhalb der untersuchten Genotypen an zufällig ausgewählten Einzelpflanzen (SS = 4 Pflanzen, SP = 4 Pflanzen, SK = 3 Pflanzen) in der gleichen Form auf (Ergebnisse nicht dargestellt). Damit ist im Ergebnis festzustellen, dass die Triebkraft der basalen Samen im Gegensatz zu den apikalen Samen deutlich größer war. Bei der vergleichenden Betrachtung der untersuchten Genotypen konnten zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen SP und SS festgestellt werden, insbesondere bezüglich des Gewichts und der Länge von Hypokotyl und Wurzeln.

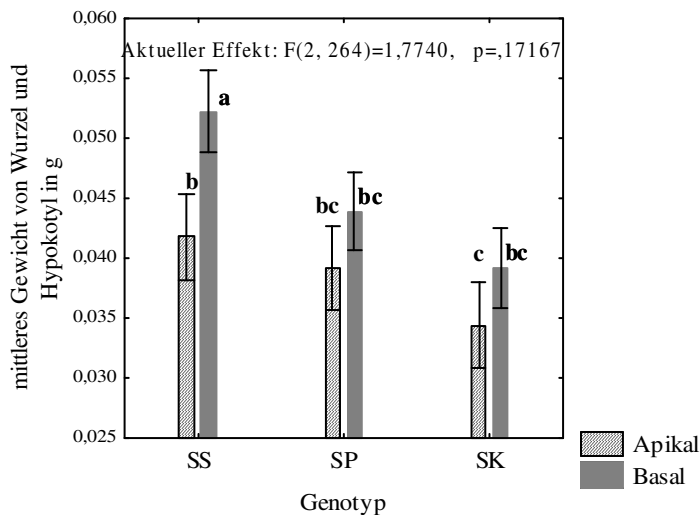


Abb. 73. Vergleichende Darstellung der Triebkraft der Keimlinge aller diploiden Genotypen auf Substrat in Abhängigkeit von der Samenposition. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Newman-Keuls-Test, $\alpha=0,05$). Vertikale Balken bedeuten 0,95 Konfidenzintervalle. $n = 50$ Samen je Genotyp und Position.

Tab. 18. Triebkraft der Keimlinge auf Substrat aller diploiden Genotypen, Mittelwerte, fett markiert und * - $p \leq 0,05$, fett markiert und ** - $p \leq 0,01$, nicht markiert - n.s.

Genotyp	Position	gesamter Keimling		Keimling oberirdisch		Seminalwurzeln und Hypokotyl		Hypokotyl		Seminalwurzeln	
		Länge	Gewicht	Länge	Gewicht	Länge	Gewicht	Länge	Gewicht	Länge	Gewicht
		cm	g	cm	g	cm	g	cm	g	cm	g
SS	Apikal	10,79	0,089	7,99	0,048	2,80	0,042**	0,54**	0,034**	2,26	0,0075
SS	Basal	10,15	0,100	7,29	0,048	2,86	0,052**	0,64**	0,044**	2,22	0,0078
SP	Apikal	11,19	0,098	8,62	0,059	2,58	0,039	0,58*	0,032	2,00	0,0068
SP	Basal	11,04	0,106	8,34	0,062	2,70	0,044	0,61*	0,036	2,09	0,0079
SK	Apikal	12,46	0,090	10,19	0,055	2,27*	0,034*	0,55*	0,028*	1,71	0,006
SK	Basal	12,85	0,096	10,42	0,057	2,43*	0,039*	0,59*	0,032*	1,84	0,007

3.4. Beziehungen zwischen Samenanlagenqualität und Samenqualität

Aufgrund der Untersuchungen zur Qualität unbefruchteter Samenanlagen sollte festgestellt werden, inwieweit dies im Zusammenhang mit der Qualität reifer und geernteter Samen stand. Dies erfolgte unter Berücksichtigung der Qualität der Mutterpflanze. Als ein zu untersuchendes Qualitätsmerkmal galt zunächst der Samenertrag (Tab. 19). Dabei wurde der Gesamtsamenertrag ermittelt. Dieser betrachtet den Samenertrag je Pflanze unter Berücksichtigung der biologischen Selektion bzw. der Konkurrenz der Samenanlagen untereinander und der Vitalität und damit der Qualität der Mutterpflanze. Der Gesamtsamenertrag setzt sich demnach aus dem Nettoertrag, dem Bruttoertrag sowie dem Kapselertrag zusammen. Der Nettoertrag ergibt sich aus der Anzahl geernteter Samen je Samenkapsel. Der Bruttoertrag beschreibt den Anteil der Samen in einer Kapsel, die sich aus den zur Verfügung stehenden Samenanlagen je Plazenta entwickelten. Der Kapselertrag schließlich beschreibt den Anteil geernteter Kapseln in Bezug auf die Anzahl bestäubter Blüten (Abb. 74).

$$\text{Gesamtertrag in \%} = \left(\frac{\text{Anzahl Samen je Kapsel} \times \text{Geerntete Kapseln}}{\text{Anzahl Samenanlagen je Fruchtknoten} \times \text{Bestäubte Blüten}} \right) \times 100$$

$$E_G \% = \left(\frac{n_S \times n_K}{n_{Sa} \times n_B} \right) \times 100$$

Abb. 74. Formel zur Berechnung des Gesamtsamenertrages in %

Es konnte ermittelt werden, dass sich bei allen diploiden Genotypen nur etwa 20 % aller Samenanlagen zu optisch reifen Samen entwickelten. Innerhalb der diploiden Genotypen gab es demnach hinsichtlich des Bruttoertrags keine signifikanten Unterschiede. Deutliche und zum Teil signifikante Unterschiede innerhalb der untersuchten Genotypen konnten hinsichtlich des Nettoertrags sowie des Kapselertrags ermittelt werden. Bei beiden untersuchten Parametern wies die SP die höchsten Werte auf, und innerhalb der diploiden Genotypen hatte die SK die niedrigsten Werte. Diese Unterschiede schlugen sich letztlich ebenfalls im Gesamtsamenertrag nieder. Den größten Gesamtsamenertrag hatte die SP. Dagegen war der Gesamtsamenertrag bei der SK am geringsten. Dieser unterschied sich signifikant vom Gesamtsamenertrag bei der SP und der SS (Tab. 19).

Tab. 19. Kennzahlen aller Genotypen bezüglich Anzahl Samenanlagen und Ertragsparameter. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte innerhalb der Parameter unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (T-Test, $\alpha=0,05$).

Genotyp	Anzahl (n) Samenanlagen	Bruttoertrag % Samen/Samenanlagen	Nettoertrag (n) Samen/Kapsel	Anteil gebildeter Kapseln %	Gesamtertrag in %
SK	145 a	20,9 a	30,5 b	23 b	4,6 b
SS	190 b	21,5 a	40,3 b	54 bc	12,5 a
SP	237 c	23,8 a	56 a	75 a	17,9 a
TK	211 d	13,2 b	27,8 b	40 bc	5,4 b

In diesem Zusammenhang konnte auch eine Beziehung zwischen den zuvor ermittelten und untersuchten Samenanlagenparametern mit dem Samenertrag nachgewiesen werden. Es wurde deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen den Parametern Stärke der Calloseeinlagerung, Abweicher aus der Callosebonitur und Embryosackheterogenität, welche als Samenanlagenqualitätsmerkmale interpretiert wurden, und den Parametern Brutto-, Kapsel- sowie Gesamtsamenertrag, welche als Samenqualitätsmerkmale galten, bestand (Abb. 75, 76, 77, 78).

Die Korrelationen waren sowohl innerhalb der untersuchten diploiden Genotypen vorhanden (Tab. 20), als auch innerhalb von allen untersuchten Genotypen, inklusive TK. Jedoch waren die

Korrelationen innerhalb der diploiden Genotypen stärker ausgeprägt. Die stärksten Beziehungen zeigten sich bei den Parametern mittlerer Samenertrag (Samen je Kapsel) und Stärke der Calloseeinlagerung bzw. Samenertrag und Embryosackheterogenität.

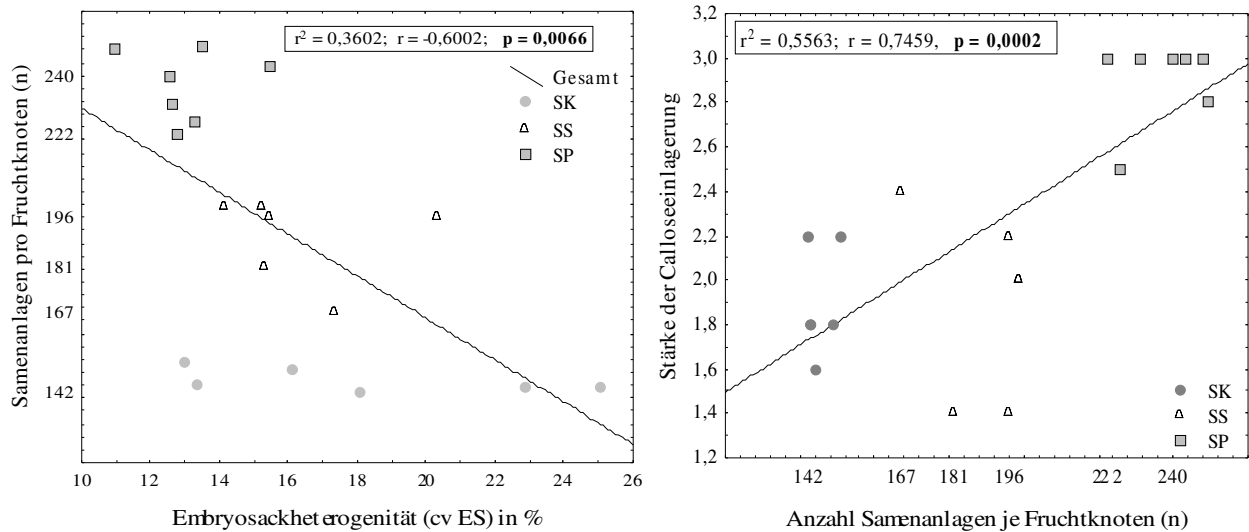


Abb. 75. Beziehung zwischen Anzahl Samenanlagen je Plazenta zur Embryosackheterogenität (links) sowie zur Stärke der Calloseeinlagerung (rechts).

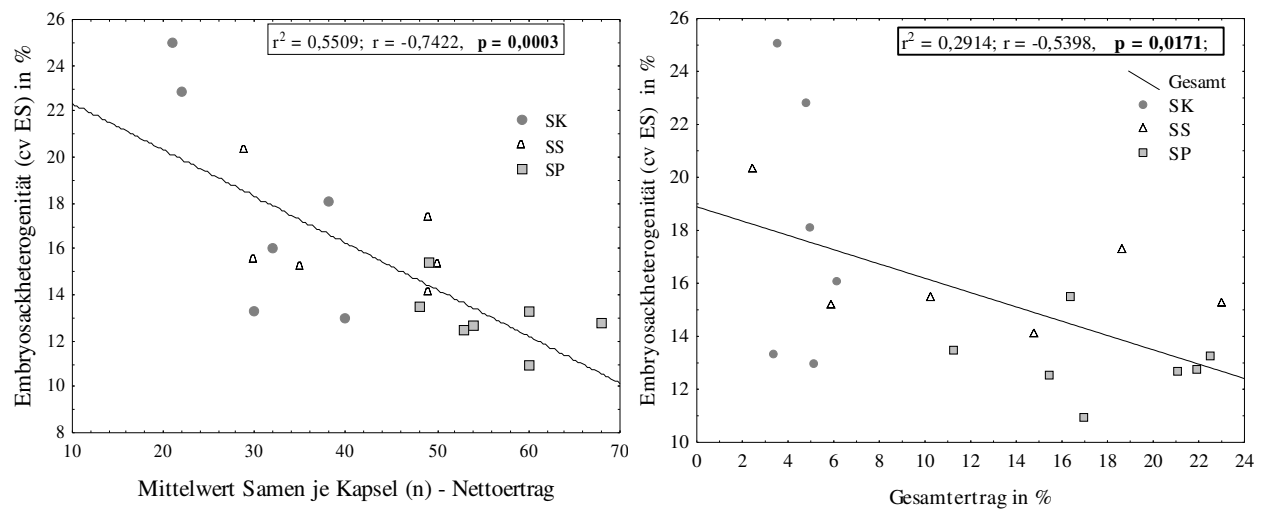


Abb. 76. Beziehung zwischen Embryosackheterogenität zum Nettoertrag (links) sowie zum Gesamtertrag (rechts).

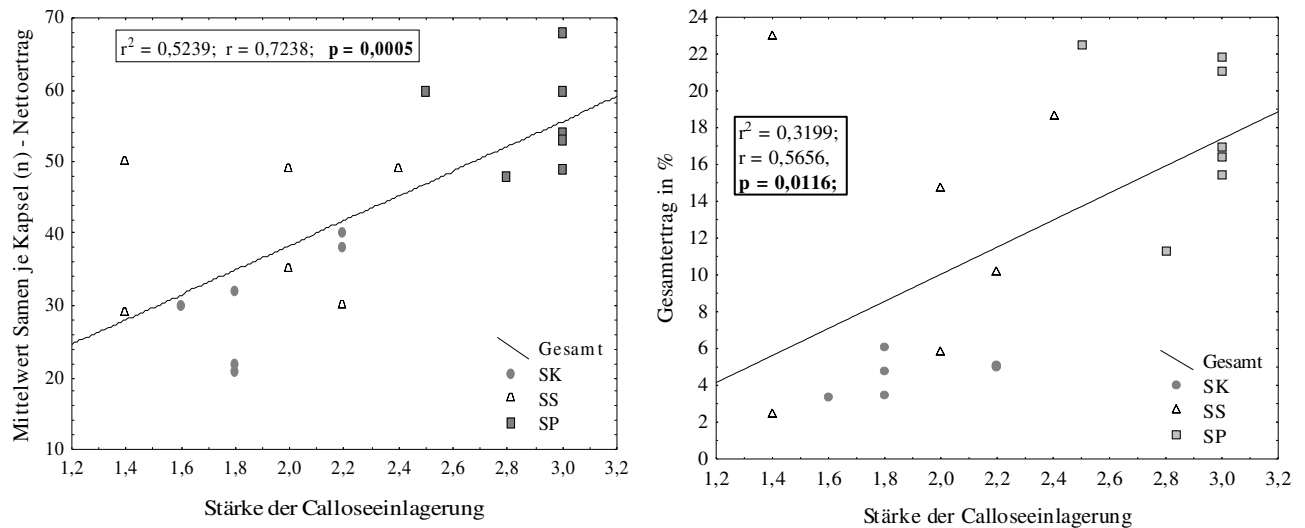


Abb. 77. Beziehung zwischen Stärke der Calloseeinlagerung zum Nettoertrag (links) sowie zum Gesamtertrag (rechts).

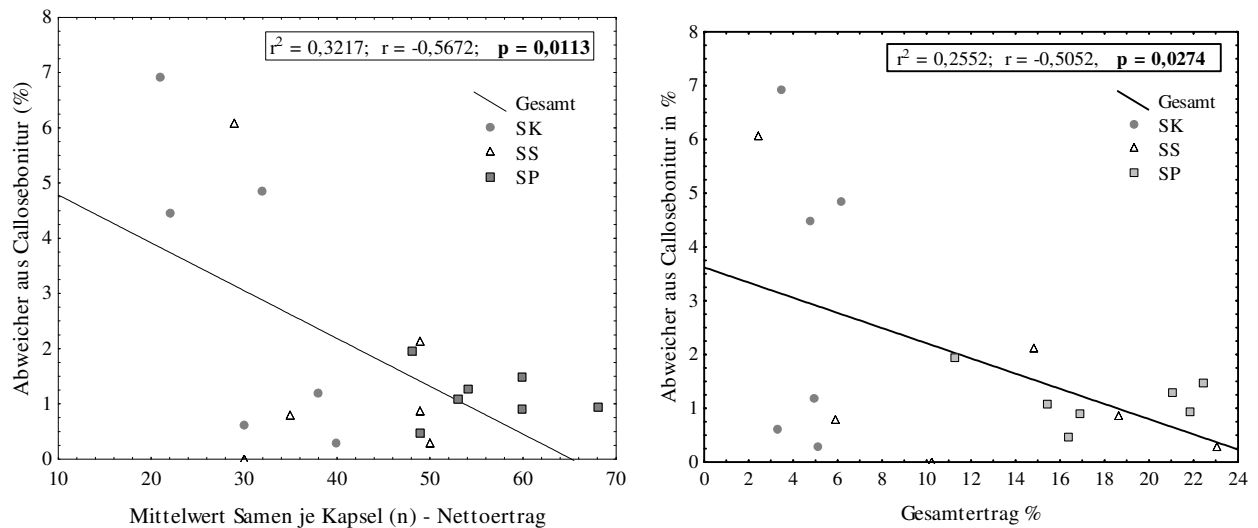


Abb. 78. Beziehung zwischen Abweichern aus Callosebonitur zum Nettoertrag (links) sowie zum Gesamtertrag (rechts).

Tab. 20. Korrelationen zwischen Samenanlagen und Ertragsparametern nach Regressionsanalyse aller Einzelwerte von allen diploiden Genotypen (links) sowie von allen Genotypen inkl. TK (rechts). Mit *markierte Werte sind signifikant, ** = sign $p \leq 0,01$, * = sign. $p \leq 0,05$, ohne * = nicht signifikant.

	Callose	Abweicher %	cv ES
Callose	1		
Abweicher	-0,45*	1	
cv ES	-0,56*	0,76**	1
Bruttoertrag	0,34	-0,55*	-0,54*
(n) S.anlagen	0,75**	-0,35	-0,60**
Nettoertrag	0,72**	-0,57*	-0,74**
Kapselertrag	0,63**	-0,49*	-0,51*
Gesamtertrag	0,57*	-0,50*	-0,54*

(Alle diploiden Genotypen)

	Callose	Abweicher	cv ES
Callose	1		
Abweicher	-0,52**	1	
cv ES	-0,59**	0,77**	1
Bruttoertrag	-0,06	-0,18	-0,24
(n).S.anlagen	0,72**	-0,38	-0,60**
Nettoertrag	0,35	-0,32	-0,51**
Kapselertrag	0,42*	-0,36	-0,42*
Gesamtertrag	0,29	-0,31	-0,39

(Alle Genotypen, inkl. TK)

Neben den festgestellten Beziehungen zwischen den untersuchten Samenanlagenqualitätsparametern und dem Ertrag wurden weiterhin Korrelationen zwischen den benannten Samenanlagenparametern und den Samenqualitätsmerkmalen Proteinkonzentration, Samengewicht, Keimfähigkeit und Triebkraft ermittelt (Tab. 21). Es konnten zwar Korrelationen festgestellt werden, diese waren jedoch nicht signifikant. Somit konnte im Ergebnis festgestellt werden, dass es durchaus eine enge Beziehung zwischen den Samenanlagenqualitätsmerkmalen Calloseeinlagerung, Abweichen aus Callosebonitur sowie Embryosackheterogenität zum Samenertrag existierte, darüber hinaus jedoch die Beziehungen der genannten Samenanlagenmerkmale zu den Samenqualitätsmerkmalen Proteinkonzentration, Samengewicht, Keimfähigkeit und Triebkraft statistisch nicht gesichert war.

Tab. 21. Korrelation der Parameter Calloseeinlagerung und Embryosackheterogenität mit Samenqualität (nach Spearman-Rangkorrelationsanalyse).

	Saatgutqualität			
	Proteine	Keimfähigkeit	Triebkraft	Samengewicht
Calloseeinlagerung	-0,30	0,26	-0,24	-0,13
Embryosack-Heterogenität (cv ES)	0,37	-0,32	0,07	0,05

3.5. Korrelationen zwischen den Samenparametern und der Keimfähigkeit sowie der Triebkraft

Bezüglich der Parameter Samengewicht und Keimfähigkeit konnte für die diploiden Genotypen SK und SS ein Zusammenhang nachgewiesen werden (Tab. 22). Schwerere Samen keimten deutlich besser. Auch hier konnte der zuvor beschriebene Positionseffekt wieder beobachtet werden, sodass die schwereren basalen Samen auch deutlich besser keimten, als die leichteren apikalen Samen. Auch beim Genotyp SP keimten die schwereren basalen Samen im Mittel besser, als die leichteren apikalen (Tab. 22, ↑Abb. 57,67). Dieser Effekt ist jedoch statistisch nicht gesichert.

Bezüglich der Kohlenhydratgehalte im Samen konnte gezeigt werden, dass sowohl der Gehalt an reduzierten Zuckern als auch der Saccharosegehalt in den basalen Samen deutlich niedriger war, als in den apikalen Samen (↑Abb. 58). Auch hier traf in Bezug auf die Keimfähigkeit in Beziehung zur Samenposition das eben Gesagte zu, sodass damit im Ergebnis eine negative Korrelation zwischen Gesamtkohlenhydratgehalt und Keimfähigkeit gefunden werden konnte.

Bezüglich des Gehaltes an löslichen Proteinen traf zumindest für die Genotypen SS und SK das eben Gesagte zu (Tab. 23). Beim Genotyp SP war keine statistisch gesicherte Beziehung zwischen dem Proteingehalt und der Keimfähigkeit vorhanden (Tab. 23). Es gab aber eine eindeutige Korrelation von Samengewicht mit der Triebkraft der Keimlinge bei allen diploiden Genotypen (Tab. 22). Ebenso war

bei allen diploiden Genotypen ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt löslicher Proteine im Samen und der Triebkraft der Keimlinge zu erkennen (Tab. 23).

Tab. 22. Korrelation von Samengewicht zu Triebkraft und Keimfähigkeit aller diploiden Genotypen (nach Spearman Rangkorrelation). Mit *markiert = signifikant bei $p \leq 0,05$, unmarkiert = nicht signifikant.

Genotyp	Triebkraft			Saatgutqualität
	Gewicht in g		Länge (cm)	Keimfähigkeit
	Wurzel+Hypokotyl	Hypokotyl	Hypokotyl	
SS	0,72*	0,78*	0,81*	0,41
SK	0,89*	0,89*	0,66	0,76
SP	0,67	0,59	0,49	-0,16

Tab. 23. Korrelation von Proteingehalt in den Samen mit Keimfähigkeit und Triebkraft aller diploiden Genotypen (nach Spearman Rangkorrelationsanalyse), mit *markiert = signifikant bei $p \leq 0,05$, mit **markiert = signifikant bei $p \leq 0,01$, unmarkiert = nicht signifikant.

Genotyp	Triebkraft			Saatgutqualität	
	Gewicht in g		Länge (cm)	Keimfähigkeit	Samengewicht
	Wurzel+Hypokotyl	Hypokotyl	Hypokotyl		
SS	0,66	0,76*	0,72*	0,75*	0,86**
SK	0,43	0,43	0,77	0,33	0,77
SP	0,61	0,64	0,83*	-0,11	0,36

4 Diskussion

4.1. Samenanlagenmerkmale

4.1.1. Allgemeine Anatomie und Morphologie

Die Untersuchungen zur Morphologie der Samenanlagen an den verwendeten Genotypen zeigten, dass die Samenanlagen der *Cyclamen* durch die Lokalisation der Mikropyle dem hemianatropen Aufbau entsprechen und nicht wie bisher angenommen, vom anatropen Typ sind (Schlagorsky 1949, Johri et al. 1992). Dies zeigt sich insbesondere dadurch, dass sich die Mikropyle in einem Winkel von ca. 90° vom Funikulus befindet und auch der Nucellus eine derart gekrümmte Form aufweist. Die Organisation des Embryosacks, der dem Polygonumtyp entspricht, konnte dagegen bestätigt werden (Casper 1956, Johri et al. 1992). Dabei waren zum Zeitpunkt der Untersuchung nur noch die Eizelle, der diploide Embryosackkern und die zwei Synergiden sichtbar, die Antipoden am Chalazapol jedoch nicht mehr. Außergewöhnlich war dabei die Tatsache, dass der gesamte Eiapparat im Verlauf der Blütenentwicklung, von Anthesebeginn bis 10 Tage danach, seine Position innerhalb des Embryosacks veränderte, von der Primärposition am Mikropylarpol hin zum Chalazapol, unterstützt von filamentären Strukturen im Embryosack. Möglicherweise ist dies eine Reaktion auf eine zuvor erfolgte Befruchtung der Eizelle und der Beginn der Embryonalentwicklung. Die Integumente umschließen die Samenanlage bis auf den Bereich der Mikropyle vollständig (Mayer und Poljakoff-Mayber 1988). Die unterschiedlichen Formen und Ausbildungen der Samenanlagen an einer Plazenta deuten wahrscheinlich schon auf eventuell auftretende Entwicklungsunterschiede bzw. Anfänge von Degenerationserscheinungen oder missgebildete Samenanlagen hin. Dies wurde bereits bei *Carica Papaya*, bei denen abortierte Samenanlagen eine reduzierte Größe und degenerierte Integumente aufwiesen (Bautista et al. 1999), sowie bei *Medicago sativa*, bei denen eine gestörte Integumententwicklung zur Sterilität führte (Bingham und Hawkins-Pfeiffer 1984), beschrieben. Auch bei Avocado waren nur 20% der Samenanlagen normal ausgebildet (Tomer und Gottreich 1976). Weiterhin wurde bei *Ipomoea nil* berichtet, dass abortierte Samenanlagen in der Regel kleiner waren als normale (Miyajima et al. 2003). Aber auch der Grad der Ploidie ist ein Hauptfaktor für die Größe der Samenanlagen. Demnach ist ein höherer Ploidiegrad verbunden mit größeren Samenanlagen, wie an *Corydalis* gezeigt werden konnte (Fukuhara 2000).

Der wulstartige Rand der Mikropyle wird im Wesentlichen von den Integumenten gebildet. Diese mikropylare Ausstülpung wird als Obturator bezeichnet und steht wahrscheinlich mit der Weiterleitung der Pollenschläuche im Zusammenhang (Ehrendorfer in Strasburger 1997, Herrero 2000, Herrero und Hormaza 1996, Tilton et al. 1984). Bei *Pistacia vera* (Martinez-Palle und Herrero 1995, 1998) sowie bei *Prunus cerasus* (Cerovic et al. 1999) wurden ebenfalls Obturatoren in Verbindung mit dem Einwachsen der Pollenschläuche beschrieben. Auch die Mikropyle selbst, mit dem anschließenden Mikropylkanal, der eine Verbindung zwischen der Samenanlagenumgebung

und dem Embryosack herstellt, ist funktional offenbar ebenso an der Pollenschlauchleitung in die Samenanlage beteiligt. In diesem Zusammenhang wurde bei *Pseudotsuga menziesii* ein Mikropylarkanal detektiert, dessen Zellen ein nach außen zur Mikropyle gerichteten Bestäubungstropfen absondern (Aderkas und Leary 1998).

Bei *Galanthus nivalis* (Chudzik und Sniezko 2003) und *Nicotiana tabacum* (Tian und Russel 1996) wurde ebenfalls von einem Mikropylarkanal berichtet.

Außergewöhnlich erscheint bei den eigenen Untersuchungen der große Durchmesser der Mikropyle im Verhältnis zum Durchmesser der Pollenschläuche.

Die Leitbündelanordnung in der Plazenta und in den Samenanlagen der geprüften *Cyclamen* entspricht dem in der Literatur allgemein beschriebenen Aufbau, wonach das Leitbündel des Fruchtblattes sich über den Funikulus in die Integumente verlängert und sich dort verzweigt (Eschrich 1995), wobei der Embryosack nicht an das Leitsystem angeschlossen ist (Juritza 1987). Dies zeigte sich auch in den eigenen Untersuchungen, wonach die Plazenta sieben Leitbündelstränge durchziehen, die sich regelmäßig seitlich verzweigen. Ebenso konnte ein Leitbündel im Funikulus detektiert werden, welches sich an der Chalaza in zwei Seitenzweige verzweigte und dann an den Integumenten entlang verlief.

4.1.2. Spezielle anatomische Untersuchungen - Embryosackheterogenität

Neben den unterschiedlichen Grundformen der Samenanlagen an einer Plazenta konnten Heterogenitäten in der Form bzw. der Fläche der Embryosäcke festgestellt werden. Vom Phänomen der Ungleichheit der Embryosäcke wird in der Literatur in vielfältiger Weise berichtet.

Bei *Medicago sativa* wird die Embryosackheterogenität als Ursache für schlechten Samenertrag angesehen (Oryol und Kazachkovskaya 1991). Auch bei *Prunus* wurde die Embryosackheterogenität beschrieben, als Zeichen eines Nichtvorhandenseins einer funktionellen Eizelle, verbunden mit einem schlechten Fruchtertrag (Eaton und Jamont 1964). Bei *Ipomoea nil* gab es einen Zusammenhang zwischen abortierten Samenanlagen und gleichzeitiger Embryosackdegeneration (Miyajima et al. 2003). Dies wurde auch bei Oliven festgestellt (Rapoport und Rallo 1990). Bei *Petunia inflata* erkannte man einen Zusammenhang zwischen Embryosackheterogenität und ausbleibender Befruchtung, welches letztlich ebenso zu einem verminderten Samenertrag führte (Lee et al. 1997). Grundlegende Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* erbrachten zweifelsfrei, dass ein normal entwickelter Gametophyt für das direkte Pollenschlauchwachstum erforderlich ist, wohingegen defekte Samenanlagen mit anomal entwickeltem Embryosack nicht befruchtet werden (Hülkamp et al. 1995). Dies induziert, dass nur bei Vorhandensein eines komplett ausgebildeten Embryosacks, inklusive Eiapparat, eine Befruchtung möglich ist (Shimizu und Okada 2000). Die Form und die Größe des Embryosacks wird bei *Cyclamen* durch die Form und die Größe der Samenanlage bestimmt. Ein kleiner Embryosack lässt darauf schließen, dass die Samenanlage anomal ausgebildet

ist und kann daher offensichtlich als Fehlbildung mit verminderter Funktionsfähigkeit interpretiert werden.

Auffallend war indes, dass zwischen den untersuchten Genotypen zum Teil erhebliche Unterschiede existierten, was darauf schließen lässt, dass die Samenanlagenqualität der einzelnen Genotypen und die damit zu erwartende Samenqualität bzw. der Samenertag offensichtlich stark variierten.

4.2. Physiologische Untersuchungen an den Samenanlagen

4.2.1. Calloseeinlagerung im Bereich des Embryosacks

Die Calloseeinlagerung war bei allen untersuchten Genotypen vergleichbar. Übereinstimmend konnte bei allen eine Zunahme der Calloseeinlagerung 3 Tage vor Anthesebeginn sowie zu Anthesebeginn beobachtet werden. 3-5 Tage nach Anthesebeginn und folgend gab es einen deutlichen Rückgang der Calloseeinlagerung. Über den genauen Ablauf dieser Einlagerung sowie über biochemische Details der Callosesynthese und schließlich über den biologischen Sinn sowie die Folgen dieses Phänomens herrscht in der Literatur nach wie vor Uneinigkeit.

Biochemisch besitzt Callose einen ähnlichen Aufbau wie Cellulose. Callose ist ein Polyglucan aus beta 1-3 glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, die vorwiegend linear miteinander verbunden sind. Daneben können durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken beta 1-4 bzw. beta 1-6 Bindungen zwischen benachbarten Molekülketten entstehen. Das Polymer besitzt eine helikale Struktur, an die Anilinblau gebunden wird. Dies führt unter UV-Anregung zu einer grün-gelblichen Fluoreszenz. Die Biosynthese der Callose erfolgt an rosettenförmigen Proteinkomplexen der Plasmamembran. Es wird davon ausgegangen, dass der Callose-Synthase-Komplex und der Cellulose-Synthase-Komplex identisch sind. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym ist die Cellulose-Glycosyltransferase und ist Teil eines Membrankomplexes im Plasmalemma (Sitte in Strasburger 1998, Richter 1988). Im Normalfall wird an diesem Enzymkomplex die Cellulosesynthese katalysiert. Manchmal kommt es zu einer Entgleisung dieser Reaktion. Statt beta 1-4 Bindungen des Glucans werden nun beta 1-3 Bindungen geknüpft. Für diese Reaktion ist Calcium als Cofaktor essenziell (Gayle und Franceschi 2000). Sowohl der Cellulose-Synthase-Komplex, als auch der Callose-Synthase-Komplex können spezifisch oder unreguliert auf biotischen und abiotischen Stress antworten (Verma und Hong 2001). An *Gossypium hirsutum* konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoff sowohl in Cellulose, als auch in Callose eingebaut werden kann, begünstigt durch die Anwesenheit von Calcium (Amor et al. 1995).

Obwohl Calloseeinlagerung in vielen Untersuchungen an verschiedenen Pflanzenfamilien und Vertretern aus den Pflanzenfamilien beschrieben wurde, ist nach wie vor unklar, ob es sich hierbei um eine Schutzreaktion der Samenanlage gegen Selbstbestäubung (Le Roux et al. 1996) oder um eine frühes Zeichen fortschreitender Degeneration der Samenanlage (Stösser und Anvari 1982, Dittmann 1998, Detzel 1998), oder gar um ein Zeichen einer Pilzinfektion der Samenanlage (Cohan et al. 1990,

Jacobsen und Berry 2002) handelt. In diesem Zusammenhang wird aber auch diskutiert, ob Calloseeinlagerung aufgrund der damit verbundenen eingeschränkten Permeabilität zwischen den Zellwänden und dem somit verhinderten Metabolittransport zwischen den Zellen bzw. Geweben zu einer zeitweiligen Isolation des Embryosacks von den umliegenden Geweben führt, welche eine ungehinderte, autonome Entwicklung des Embryosacks fördern und ihn vor schädigenden exogenen Einflüsse schützen soll (Kapil und Tiwari 1978, Tiwari 1982, Colombo und Kapil und Bhatnagar 1981, Bouman 1984, Colombo und Angenent 1999).

Bei der Entwicklung der Megasporenmutterzelle, genauer bei den meiotischen Teilungen, ist das Auftreten von Callose um die Dyaden, Triaden und Tetraden ein vielfach beschriebenes Phänomen (Porceddu et al. 1999, Tucker 2001). Wahrscheinlich soll diese Calloseeinlagerung zur Degeneration der drei Megasporen führen (Rodkiewicz 1970, Huang und Russel 1992).

Grundlegende Untersuchungen zur Calloseeinlagerung im Rahmen der Embryogenese wurden schließlich an *Arabidopsis thaliana* durchgeführt (Webb und Gunning 1994).

Vielfach wird Calloseeinlagerung in Verbindung mit einer Sterilität der Samenanlagen beschrieben, so bei *Medicago sativa* (Rosselini et al. 1998 und 2003, Kolyasnikova 1985) sowie anderen *Medicago* Arten (Oryol et al. 1986). Samenanlagen mit Calloseeinlagerung gelten demnach als steril und nicht funktionell (Knox et al. 1986) sowie lebensunfähig (Dumas und Knox 1983).

Auch Degenerationserscheinungen an Samenanlagen sind oftmals mit Calloseeinlagerung verbunden. Dies erbrachten Untersuchungen an *Prunus dulcis* (Pimienta und Polito 1982), *Prunus armeniaca* (Rodrigo und Herrero 1998) sowie anderen *Prunus* Arten (Stösser und Anvari 1982). Auch bei *Carica papaya* fand man in 90% der abortierten Samenanlagen Callose, hier vor allem im Bereich des Funikulus (Bautista-Calles et al. 1999). Dies spricht für die selektive Permeabilität der mit Callose behafteten Zellwände und den damit beeinträchtigten Metabolittransport in die Samenanlage.

Im Gegensatz zu den oben genannten möglichen Funktionen der Calloseeinlagerung wird aber auch noch diskutiert, ob die Calloseeinlagerung möglicherweise mit dem Pollenschlauchwachstum, genauer mit der Pollenschlauchführung, in Verbindung steht. So bei *Pistacia vera*, bei der Callose vor allem im Bereich eines Ponticulus auftrat, wobei hier die Zellen dieses Ponticulus Callose bilden und absondern (Martinez-Palle und Herrero 1995). Nach der Pollenschlauchpenetration isoliert sich die Samenanlage durch die Callose in den Nucelluswänden vom übrigen Gewebe (Martinez-Palle und Herrero 1995). Bei *Ipomoea purpurea* wurde beobachtet, dass das Transmissionsgewebe im Stigma, durch das die Pollenschläuche wachsen müssen, eine hohe Konzentration an Callose aufweist (Diaz-Pontones 2000). Auch bei *Galanthus nivalis* wurde neben Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Calcium vor allem Callose im Mikropylarkanal gefunden und diesen Substanzen eine direkte Bedeutung für das Pollenschlauchwachstum zugeschrieben, nicht zuletzt dadurch begründet, dass der Anteil der Substanzen nach der Bestäubung deutlich zunahm und diese Substanzen in sterilen Samenanlagen nicht vorkam (Chudzik und Snieko 2003). Das gleiche wird bei *Paspalum* berichtet, wobei die Callose als eine Art Leitbahn fungiert, welche die Pollenschläuche über den Mikropylarkanal ins Innere der

Samenanlage führen soll (Chao 1971). Auch bei *Arabidopsis thaliana* wurde das Einwachsen der Pollenschläuche in eine callosebehaftete Samenanlage festgestellt (Raghaven 2000). Dafür spricht auch, dass in grundlegenden Untersuchungen zur Calloseeinlagerung an *Petunia hybrida* ein zeitlicher Verlauf der Einlagerung festgestellt wurde, sodass diese bei Bestäubung beginnt und nach der Befruchtung endet (Esser 1963). Die eigenen Untersuchungen an *Cyclamen persicum* können das zuletzt Genannte bestätigen. Zum einen konnte der beschriebene Verlauf in gleichem Maße festgestellt werden und zum anderen wurden mehrmals Pollenschläuche beobachtet, die in die callosebehafteten Samenanlagen einwuchsen. Nicht zuletzt war im Bereich des Obturators und des Mikropylkanals zum Zeitpunkt des Einwachsens der Pollenschläuche die Callosekonzentration besonders hoch, sodass hier wahrscheinlich die Callose funktionell als Pollenschlauchattraktant zu betrachten ist. Demnach kann die Calloseeinlagerung hier als Phänomen in funktionsfähigen Samenanlagen definiert werden. Dem entspricht auch die Tatsache, dass zwischen den Parametern Embryosackheterogenität und Stärke der Calloseeinlagerung eine negative Korrelation besteht. Somit ist die Calloseeinlagerung und die damit verbundene biologische Wirksamkeit in Samenanlagen mit relativ homogen entwickelten Embryosäcken höher. Die festgestellten Abweicher aus der Callosebonitur sind damit als nichtfunktionelle oder vermindert funktionelle Samenanlagen zu betrachten. Dafür spricht auch die enge Korrelation von der Embryosackheterogenität und den Abweichern aus der Callosebonitur.

4.2.2. Calciumeinlagerung in den Samenanlagen nach induzierter Bestäubung

Eine notwendige Voraussetzung für die Befruchtung einer Samenanlage infolge des Eindringens eines Pollenschlauches besteht in der Selektion der Samenanlagen durch den Pollenschlauch. Dabei kommt ein Attraktivitätssignal wahrscheinlich von den Embryosäcken bzw. der Samenanlage selbst. Somit wird das chemotrope Signal von den Embryosäcken generiert (Russel 1996). Auch dies kann beobachtet werden als Ausdruck der sexuellen Selektion und evolutionär gesehen, eine der treibenden Hauptkräfte in der Entwicklung der Samenpflanzen (Haig und Westoby 1989, Schwemmler 1968). Meist geschieht das durch entsprechende Chemotropismen (Herrero und Hormaza 1996). Dabei sind vor allem chemische Signale wie Calcium, Kohlenhydrate und Proteine involviert, welche wahrscheinlich von den Synergiden ausgesandt werden (Willemse und van Lammeren 2002). Vielfach wird berichtet, dass der Obturator bzw. die Mikropyle vor allem protein- und kohlenhydrathaltige Substanzen und Exudate absondert, die die Pollenschläuche zum Einwachsen animieren sollen. So bei *Pseudotsuga menziesii* (Aderkas und Leary 1998), *Prunus persica* (Herrero und Arbeloa 1989, Arbeloa und Herrero 1987, Herrero 2001), *Pistacia vera* (Martinez-Palle und Herrero 1998) und *Gasteria verrucosa* (Franssenverheijen und Willemse 1993). Bei *Prunus* findet sogar das Pollenschlauchwachstum erst nach der sekretorischen Phase im Obturator und Mikropylkanal statt (Herrero 2000). Bei Kirschen wurde eine erhöhte Stärkekonzentration in der Mikropylarregion in den Zellen des Obturators und der Plazenta festgestellt. Die Stärke steht mit dem Pollenschlauchwachstum in direktem Zusammenhang (Cеровic et al. 1999).

Als eine weitere wichtige und dazu noch häufig vorkommende chemoattraktive Substanz für das Pollenschlauchwachstum wird Calcium angesehen (Willemse und van Lammeren 2002, Raghaven 2000). Calcium fungiert dabei vor allem als „second messenger“ in der Signaltransduktion in Pflanzen und fördert die Eizellen- und Spermazellenfusion (Yang 1999, Zhang und Cass 1997). Dabei gelangt das Calcium über spezielle Calciumkanäle und über Calciumpumpen bei Bedarf in das Zytosol (Malho 1999). Das meiste Calcium befindet sich in den Zellen innerhalb der Vakuolen und wird dort als intrazelluläres Calcium gespeichert und bei diversen Entwicklungsprozessen sowie Stressantworten der Pflanze ausgeschüttet (Sanders et al. 1998). Zahlreiche *In-vitro* Versuche belegen die Wichtigkeit des Calciums als funktioneller Chemoattraktant im Dienste der Pollenschlauchführung (Malho 1998, Faura et al. 1994, Kranz und Lörz 1994). Experimentell verursachte Veränderungen der Calciumkonzentration in Pollenschlauchnähe führt zu ungerichtetem Pollenschlauchwachstum. (Malho und Trewavas 1996). Aber auch *in vivo* spielt Calcium diesbezüglich eine ganz klare Rolle (Franklin-Tong 1999). So wurde bei *Nicotiana tabacum* vor allem um den Mikropylarkanal herum Calciumvorkommen diagnostiziert und ein Zusammenhang zwischen der Calciumakkumulation und der Fähigkeit der Samenanlage befruchtet zu werden, festgestellt (Tian und Russel 1996, Tirlapur et al. 1992). Auch bei *Antirrhinum majus* (Mascarenhas und Machlis 1962), *Petunia hybrida* (Tirlapur et al. 1992) *Crocus* (Chichiricco et al. 2002), *Oenothera hookeri* (Chudzik und Sniezko 1999), *Gasteria verrucosa* (Tirlapur und Willemse 1992), *Galanthus nivalis* (Chudzik und Sniezko 2003), *Pennisetum* (Reger et al. 1992), *Zea mays* (Antoine et al. 2001) *Helianthus annuus* (Zhang et al. 1995) und *Oryza sativa* (Yu et al. 1999) wird Calcium als hauptsächlicher Chemoattraktant für das Pollenschlauchwachstum beschrieben.

Die eigenen Untersuchungen bezüglich der Calciumakkumulation in den Samenanlagen nach induzierter Bestäubung stützten die These, dass auch hierbei Calcium als Hauptfaktor für die Pollenschlauchleitung fungiert. Vor allem die Lokalisation des Calciums im Bereich des Embryosacks und der Mikropyle bzw. des Obturators bestätigen dies. Auffallend war indes der Verlauf der Akkumulation, welche mit den Bestäubungsdaten und Pollenschlauchwachstumsdaten korrelierte. Somit ist bewiesen, dass die Calciumakkumulation, die bei allen untersuchten Genotypen festgestellt wurde, als Chemoattraktant fungierte. Derartige Verläufe der Calciumakkumulation wurden auch bei *Oryza sativa* (Zhao et al. 2002), *Triticum* (Chaubal und Reger 1992) sowie bei *Nicotiana tabacum* (Tian und Russel 1997) festgestellt. Auch bei *Plumbago zeylanica* kam es 1 Tag vor bis 3 Tage nach Anthesebeginn in bestäubten Blüten zur Calciumakkumulation. Dabei fanden sich Calcium Cluster vor allem im Bereich der Mikropyle und um den Embryosack herum verteilt. Nach der Befruchtung konnte ein deutlicher Rückgang der Calcium Cluster festgestellt werden. In unbestäubten Samenanlagen blieb dagegen die Calciumkonzentration nahezu unverändert hoch (Tian und Russel 2000). Darüber hinaus wird dem Calcium neben seiner Funktion als Chemoattraktant noch eine weitere Rolle bei der Samenbildung zugeschrieben. Calcium in Form von Calciumoxalatkristallen

soll als Reserve für den Embryo dienen und wird bei der Speicherproteinsynthese mit einbezogen, wie Untersuchungen an *Glycine max* belegen (Ilarsen et al. 1997 und 2001).

4.3. Samenentwicklung

Aufgrund der eigenen Ergebnisse zur Entwicklung der Megasporenmutterzelle 5 Tage vor Anthesebeginn kann davon ausgegangen werden, dass die Entwicklung aller Samenanlagen an einer Plazenta zumindest bis zum Zeitpunkt der meiotischen Teilungen der Megasporenmutterzelle synchron erfolgt. Gleiches wurde auch von *Melilotus officinalis* berichtet (Akhalkatsi et al. 1999). Jedoch ist unklar, ob nach Beendigung der meiotischen Teilungen der Megasporenmutterzelle, also spätestens zu Anthesebeginn alle vorliegenden Samenanlagen einer Plazenta den gleichen Reifestatus besitzen. Von *Narcissus triandrus* wurde berichtet, dass die Samenanlagenentwicklung zu Anthesebeginn asynchron war (Sage et al. 1999). Die eigenen Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Embryosackheterogenität und Calloseeinlagerung zu Anthesebeginn konnten dies ebenfalls bestätigen. Hier waren zum Zeitpunkt des Anthesebeginns Unterschiede innerhalb einer Plazenta feststellbar, was darauf schließen lässt, dass zu diesem Zeitpunkt entweder vermehrt abortierte und somit in ihrer Entwicklung stagnierte Samenanlagen vorlagen, oder aber auch Samenanlagen mit unterschiedlichen Entwicklungsstufen. Es ist fraglich, ob zum Zeitpunkt des Anthesebeginns überhaupt eine physiologische Reife der Samenanlagen zu erwarten ist. Gegenwärtige und in der Vergangenheit durchgeführte Bestäubungsversuche an *Cyclamen persicum* belegen, dass die vor Anthesebeginn bestäubten Blüten auch einen geringen Samenertrag aufwiesen, wohingegen die nach Anthesebeginn oder unmittelbar zu Anthesebeginn bestäubten Blüten einen besseren Samenertrag hatten (Ewald und Schwenkel 1999). Auch die Tatsache, dass bei *Cyclamen* wiederholte Bestäubungen zu einem höheren Samenansatz führen, stützt diese These. Das induziert die Vermutung, dass hier zum Zeitpunkt der Anthese noch keine vollständige physiologische Reife der Samenanlagen erreicht ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei vielen Vertretern der unterschiedlichsten Pflanzenfamilien mit multiovulaten Plazenten zum Zeitpunkt des Anthesebeginns nicht alle Samenanlagen vollkommen ausgereift sind. Berichtet wurde dies u.a. bei *Prunus persica* (Herrero und Arbeloa 1989), *Pistacia vera* (Shuraki und Sedgley 1997), *Aprikose* (Alburquerque et al. 2002) und *Litchi* (Stern et al. 1997). Allen gemeinsam war, dass die Samenanlagen erst wenige Tage nach Anthesebeginn vollständig reif waren, und auch erst zu diesem Zeitpunkt eine Befruchtung stattfinden konnte. Auch in den eigenen Untersuchungen war festzustellen, dass bei Blüten, bestäubt zu Anthesebeginn, erst 4 Tage später eine Vielzahl Pollenschläuche die Samenanlagen an der Plazenta erreichten. Daher ist im Ergebnis festzustellen, dass sich die Samenanlagen einer Plazenta bei *Cyclamen persicum* zwar hinsichtlich der Teilung der Megasporenmutterzelle synchron verhalten, bis zum Anthesebeginn aber offensichtlich ihre physiologische Reife noch nicht vollständig erreicht haben und zu Anthesebeginn Unterschiede in Struktur und Physiologie dieser Samenanlagen untereinander existieren. Diese Unterschiede zeigten

sich danach im weiteren Verlauf der Samenentwicklung noch deutlicher, wie die flowcytometrischen Untersuchungen belegen konnten. Die Mitoseaktivität und der Status des Endosperms gilt als guter Marker für den Entwicklungsstand der Samen (Sliwinska 2000).

Es fiel auf, dass die Samenanlagen an einer Plazenta zum Teil erhebliche Unterschiede hinsichtlich ihres Entwicklungsstandes hatten. Die Entwicklung des Endosperms war ca. 32 Tage nach der Bestäubung nachweisbar. 63 Tagen nach der Bestäubung waren innerhalb der Samenanlagen nahezu keine oder nur noch wenig mitotische Aktivität feststellbar. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Untersuchungen an *Zuckerrüben* (Sliwinska 2000), *Zea mays* (Engelen-Eigers et al. 2000), *Azadirachta indica* (Sacande et al. 1997) und *Brassica napus* (Cheng et al. 1994) gewonnen. Die Gründe für diese Entwicklungsunterschiede der Samenanlagen von *Cyclamen* an einer Plazenta können vielfältig sein. Zum einen werden klimatische Bedingungen und die begrenzte Verfügbarkeit der Nährstoffe durch die Mutterpflanze dafür verantwortlich gemacht (Coste et al. 2001), wobei hierbei die Anzahl der Samenanlagen je Plazenta eine entscheidende Rolle spielt (Yeung und Law 1989), zum anderen der Anteil bestimmter Phytohormone, wie Abscisinsäure, entscheidend ist (Borisjuk et al. 2004). All dies sind Ausprägungen von mütterlicher Kontrolle. Vielfach wird auch berichtet, dass das Wachstum einer Samenanlage auf Kosten einer anderen, meist der direkt benachbarten Samenanlage geht, auch aus Gründen der begrenzten Nährstoffverfügbarkeit (Rodrigo und Herrero 1998). Zumeist ist dies auch mit dem Absterben der benachteiligten Samenanlage verbunden (Rigney 1995, Mogensen 1975, Sedgley 1981).

4.4. Samenqualität

4.4.1. Inhaltsstoffe als „innere Qualität“ der Samen

Die biochemischen Analysen zu den Kohlenhydratkonzentrationen im Samen offenbarten, dass die Saccharose gegenüber den reduzierten Zuckern Glucose und Fructose mengenmäßig deutlich überwog. Im Vergleich der reduzierten Zucker bildete dagegen die Fructose die Fraktion mit der höheren Konzentration. Diese Art der Zusammensetzung mit der entsprechenden Verteilung ist bereits mehrfach und grundlegend beschrieben worden. Dabei kommt die Saccharose in vielen Pflanzensamen häufig als gelöstes Kohlenhydrat vor (Mayer und Poljakoff-Mayber 1988, Weber et al. 1998). So war bei *Phaseolus vulgaris* deutlich mehr Saccharose im Samen vorhanden als Monosaccharide (Bailly et al. 2001). Festgestellt wurde dies auch an *Erythrina caffra* (Nkang 2002), *Glycine max* (Egli und Bruening 2001) und *Vicia faba* (Cochrane 1999). Bei *Lupinus luteus* (Gorecki et al. 1997), *Theobroma cacao* (Bucheli et al. 2001, Dangou et al. 2002) und *Vicia narbonensis* (Neubohn et al. 2000) liegt dagegen das beschriebene Konzentrationsverhältnis in umgekehrter Weise vor, sodass hier die Monosaccharide gegenüber der Saccharose mengenmäßig dominieren.

Bei *Cyclamen persicum* fand man im Zusammenhang mit der Untersuchung an den Petiolen ebenfalls eine hohe Saccharosekonzentration (Rothe et al. 1999).

Das Vorhandensein und die Höhe der Konzentration der Kohlenhydrate ist eng mit der Samenentwicklung und Samenreife verbunden. Dabei kann in sich entwickelnden Pflanzengewebe der spezifische Zuckergradient eine Kontrollfunktion ausüben (Borisjuk et al. 1999) und fungiert damit als Signal, welches die Samenentwicklung reguliert und beeinflusst (Wobus und Weber 1999). Vielfach wird berichtet, dass eine hohe Kohlenhydratkonzentration assoziiert ist mit mitotischer Aktivität (Weber et al. 1997). Dies induziert die Schlussfolgerung, dass mit Abnahme der mitotischen Aktivität, also mit Erreichung der physiologischen Reife des Samens, die Kohlenhydratkonzentration geringer ist als im vorangegangenen Entwicklungsprozess (Rediske 1969). Zu erklären ist diese Tatsache dadurch, dass zum einen mit der Samenreife und der damit verbundenen Trennung von der Mutterpflanze der Metabolittransport, also der Transport der Kohlenhydrate in den Samen unterbunden wird und zum anderen, dass sowohl die reduzierten Zucker, als auch die Saccharose mit fortschreitender Reife des Samens zunehmend in die Speichersubstanzen integriert werden. Dabei ist ein Anstieg der Speicherkohlenhydrate im Samen und eine gleichzeitige Reduktion der dafür notwendigen Bausteine, also in diesem Falle der Monosaccharide und der Saccharose, zu erwarten. Hierbei hat die Saccharose offensichtlich eine Signalfunktion für die Induzierung der Stärkebiosynthese und ist auch verantwortlich für das Einstellen der mitotischen Aktivität in reifen Organen und Geweben, wie dies an *Vicia faba* festgestellt werden konnte (Borisjuk et al. 2004). Zahlreiche Untersuchungen bestätigen die Fluktuation der Kohlenhydrate im Samen und ihre Funktion als Ressourcen zum Aufbau der Speichersubstanzen (Cochrane 1999, Wittich und Willemse 1999, Weschke et al. 2000, Te Krony und Egli 1997, Phartyal et al. 2001). Der Stärketest im Endosperm in den eigenen Untersuchungen verlief negativ, sodass davon ausgegangen wird, dass anstatt der Stärke im Samen von *Cyclamen* ein anderes Reservekohlenhydrat existieren muss. Dabei handelt es sich um Xyloglucan, welches auch bereits im Samen von *Cyclamen* nachgewiesen werden konnte (Braccini et al. 1995). Des Weiteren wurde Xyloglucan auch als Hauptreservekohlenhydrat in *Tropaeolum majus* (Hensel et al. 1991), und *Tamarinde* (Braccini et al. 1995) nachgewiesen.

Bei der quantitativen Analyse der Konzentration der löslichen Proteine nach Bradford zeigten sich zwischen den untersuchten Genotypen erhebliche Unterschiede in der Proteinkonzentration. Dies könnte ein Zeichen von eventuell mangelnder Stickstoff- und Schwefelverfügbarkeit für die Mutterpflanzen während der Samenentwicklung sein (Peak et al. 1997, Moreno et al. 2003). Die Versuchsanordnung und die generelle Versorgung der Mutterpflanzen in den eigenen Untersuchungen ist aber offensichtlich nicht der Hauptgrund für diese Schwankungen, denn wie die Bodenanalysen zeigten, hatten die Genotypen SS und SP gegenüber Genotyp SK einen deutlich höheren N-Status der Ernährung erhalten. Trotzdem war die Konzentration der löslichen Proteine bei SP deutlich vermindert gegenüber SK. Daher könnte es sich um eventuelle Störungen im N-Stoffwechsel der Mutterpflanze handeln, dies wurde jedoch in der Form nicht untersucht. Möglicherweise ist dies aber auch Ausdruck des Konkurrenzkampfes der Samen um die verfügbaren Nahrungsressourcen der Mutterpflanze untereinander. Auf Grund dessen wird angenommen, dass das source-sink-Verhältnis ein

genotypabhängiges Merkmal ist. Die Untersuchungen an den Einzelpflanzen der Genotypen bestätigen diese Annahme, denn auch innerhalb der Einzelpflanzen konnten die zuvor beschriebenen Konzentrationen beobachtet werden. Die anschließende mikroskopische Proteindichtebestimmung nach der planimetrischen Methode bestätigt zudem diese Annahme, denn auch hier war die Dichte beim Genotyp SS gegenüber SP deutlich höher. Es konnte aber auch festgestellt werden, dass zwischen den Einzelpflanzen der untersuchten Genotypen Unterschiede existieren. Dabei könnte es sich um die eben erwähnten Störungen innerhalb der Mutterpflanze oder um die Auswirkungen des Konkurrenzkampfes der Samen um die zur Verfügung stehenden Nahrungsressourcen handeln.

Die in den eigenen Untersuchungen festgestellte negative Korrelation zwischen der Saccharosekonzentration und der Konzentration löslicher Proteine im Samen wurde in dieser Form bereits bei *Glycine max* beschrieben (Hartwig et al. 1997).

Untersuchungen von Corke et al. (1990) und le Gal et al. (1984) wiesen an *Pisum sativum* einen Zusammenhang zwischen Saccharosekonzentration und Mitoseaktivität sowie zwischen Proteingehalt und relativem DNA-Gehalt nach. Wenn demnach sich mit zunehmender Samenreife die Saccharosekonzentration vermindert und gleichzeitig die Mitoseaktivitäten abnehmen, so kann man davon ausgehen, dass aufgrund der negativen Korrelation zwischen Saccharose und Proteinkonzentration, eine erhöhte Proteinkonzentration ebenfalls als Zeichen der Samenreife gewertet werden kann. Demnach sind die Unterschiede zwischen den Einzelpflanzen innerhalb der untersuchten Genotypen offensichtlich auf unterschiedliche Reife der Samen innerhalb einer Samenkapsel zurückzuführen. Auch in der Literatur gilt der Proteingehalt dementsprechend als guter Marker für die Einschätzung der Embryo- und Samenentwicklung (Jeyaretnan et al. 1999) und ein Zusammenhang wurde in dieser Form bereits bei Flachs nachgewiesen (Pretova et al. 2001).

Die ebenfalls mittels planimetrischer Analyse erhaltenen Werte zur Dichte der Lipide im Endosperm der Cyclamensamen bestätigen, dass neben den erwähnten Reservekohlenhydraten auch die Lipide als Reservesubstanzen eine große Bedeutung haben (Johri et al. 1992). Lipide als Triacylglyceride in Form kleiner Öltröpfchen werden oft als Kohlenstoffquelle gebildet und fungieren somit als Reservesubstanz. Hauptkohlenstofflieferant dabei ist die Saccharose (Wallis et al. 1999). Ein Zusammenhang von hohem Ölgehalt und niedrigem Proteingehalt wurde bereits an *Brassica napus* festgestellt (Lühs et al. 2000) und schon grundlegend beschrieben (Mayer und Poljakoff-Mayber 1988). Untersuchungen zur Protein- und Lipidkonzentration in Samen mit Hilfe der Mikroskopie wurden in der Vergangenheit bereits an *Bulnesia schickendantzii* (Maldonado et al. 1998), *Foeniculum vulgare*, *Anethum graveolens*, *Trachyspermum ammi* (Johri und Shagal 1966), *Pisum sativum* (Gal le et al. 1984) und *Tillandsia* (Fiordi et al. 2001) durchgeführt.

4.4.2. Samengewicht, Keimfähigkeit und Triebkraft

Auch bei der Auswertung der Versuche zur Triebkraft zeigten sich zwischen den untersuchten Genotypen erhebliche Unterschiede. Der Anteil normal entwickelter Keimlinge (International Seed Testing Association ISTA, Beckendam und Grob 1979) war bei der SP in allen Versuchen deutlich höher als bei den Genotypen SS und SK. Unterschiede zeigten sich auf den einzelnen Nährmedien, wobei auf Vermehrungssubstrat die besten Keimungserfolge erzielt wurden. Zurückzuführen ist dies offenbar auf die im Vermehrungssubstrat vorkommenden Nährstoffe, wohingegen bei den Keimversuchen in den Petrischalen der Keimling nur von seinen Speicherstoffen zehren muss, da exogen keine weitere Nahrung zur Verfügung steht. Die Gründe für ausbleibende oder verminderte Keimung sind vielfältig. Grundlegende Untersuchungen zur Keimung von *Cyclamen* erbrachten, dass nur physiologisch reife Samen keimten, wohingegen unreife Samen nicht keimten (Corbineau et al. 1989 a,b). Dies wurde auch bei *Styrax japonicus* (Roh et al. 2004), Wassermelonen (Nerson 2001) und Aizoaceae (Guttermann 2000) berichtet. Vielfach wird auch beschrieben, dass das Samengewicht im Zusammenhang mit der Keimfähigkeit steht, wonach große und schwere Samen besser keimen als kleine und leichte Samen. Dies wurde an *Cyclamen persicum* bereits nachgewiesen (Lee und Lee 1986). Aber auch bei anderen Gattungen ist dieser Zusammenhang beschrieben worden. So wurde bei Pfirsich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Samengewicht und Keimfähigkeit gefunden (Malcom et al. 2003), so auch bei *Raphanus sativus* (Smittle 1982), *Dalbergia miscolobium* (Sasaki und Felipe 1999), *Abutilon theophrasti* (Baloch et al. 2001), *Primula farinosa* und *Armeria maritima* (Baker et al. 1994), Weizen (Naylor 1993), *Ulmus wallichiana* (Phartyal et al. 2001), *Tragopogon pratensis* (Pico et al. 2003), *Collinsia verna* (Kalisz 1989), *Aquilegia caerulea* (Montalvo 1994), *Lupinus texensis* (Helenerum und Schaal 1996), *Campanula americana* (Galloway 2001) und *Ulex* sp. (Gutierrez 1996). Dagegen hatte bei *Chrysophyllum* sp. ein geringeres Samengewicht und eine geringere Biomasse keinen Einfluss auf die Keimfähigkeit (Green 1999). Das unterschiedliche Samengewicht ist wahrscheinlich auf mütterliche Einflüsse zurückzuführen. Dabei spielen vor allem Wachstumsbedingungen der Mutterpflanze (Mayer und Poljakoff-Mayber 1988), der Konkurrenzkampf um die verfügbaren Nährstoffe der Samenanlagen untereinander (Manasse und Stanton 1991, Hossaert und Valero 1988, Melser und Klinkhamer 2001), das Alter der Mutterpflanze (Guttermann 2000) sowie die mütterliche Photosyntheseleistung mit anschließendem Metabolittransport (Susko und Lovett-Doust 1999, 2000) eine entscheidende Rolle. Ein mütterlicher Einfluss auf die Samengröße durch unzureichendes Nahrungsangebot wurde bereits bei *Chamaecrista fasciculata* (Fenster 1991), *Medicago sativa* (Katepa Mupondwa et al. 1996), *Triticum* (Bai et al. 2003) und *Raphanus raphanistrum* (Mazer 1987) festgestellt. Aber auch die Anzahl Samen in einer Kapsel gilt als limitierender Faktor für das Samengewicht. Je mehr Samen in einer Kapsel sind, umso geringer ist das spezifische Gewicht der Samen. Diesen Zusammenhang fand man bei *Primula farinosa* und *Armeria maritima* (Baker et al. 1994) sowie bei *Medicago sativa* (Katepa Mupondwa et al. 1996) und *Melilotus officinalis* (Akhalkatsi et al. 1999).

Manche Autoren gehen allerdings auch davon aus, dass der Umwelteinfluss auf die Samenqualität höher ist als der genetische Einfluss, und dass eine Reduktion von Samenertrag, Samengewicht und damit der Keimfähigkeit in Zusammenhang mit biotischem und abiotischem Stress steht (Dornbros 1994, Guttermann 2000). Da in den eigenen Versuchen alle Genotypen unter identischen Umweltbedingungen während der Samenentwicklung und Samenreife kultiviert wurden, können die festgestellten Unterschiede in der Keimfähigkeit auf andere Faktoren zurückzuführen sein. Es ist anzunehmen, dass wie bereits zuvor bei der Kohlenhydrat- und Proteinanalyse bemerkt, Entwicklungsdefizite einzelner Samen innerhalb einer Kapsel vorlagen und deshalb die Keimungen so unterschiedlich verliefen oder in manchen Fällen sogar völlig ausblieben. Ebenfalls ist es möglich, dass innerhalb der Samenträgerpflanze nur die bereits erwähnten limitierten Nahrungsressourcen vorhanden waren, und sich deshalb die Unterschiede in der Keimfähigkeit niederschlugen. Daher kann hier ein Einfluss der Mutterpflanze angenommen werden, was bedeutet, dass der Genotyp SP aufgrund seiner höheren Keimwerte Mutterpflanzen höherer Qualität besitzt.

Ebenso wie die Keimfähigkeit wird auch die Triebkraft als Summe aller jener Saatguteigenschaften, die das Ausmaß an Aktivität und Leistungsfähigkeit eines Saatgutes während der Keimung ausmachen, durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, wie genetische Konstitution, Umweltbedingungen, source-sink-Verhältnis der Mutterpflanze, Reife der Samen, Samengröße, Samengewicht, Pathogene an den Samen und Unversehrtheit der Samen (Perry 1987). In den eigenen Untersuchungen zeigten sich Unterschiede, sodass daraus abgeleitet werden kann, dass eine hohe Triebkraft auch mit einer hohen Keimfähigkeit korreliert. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass als Maß für die Triebkraft das gesamte Keimlingsgewicht herangezogen wird. Auf Vermehrungssubstrat war das Keimlingsgewicht im Gegensatz zu dem in den Petrischalen deutlich höher. Offenbar ist auch das ein Effekt der höheren Biomasseproduktion infolge der besseren Nährstoffverfügbarkeit im Substrat. Daher wurde in den eigenen Untersuchungen Wert darauf gelegt, ein Maß zu finden, durch welches die Triebkraft und damit die Leistungsfähigkeit der Keimlinge am besten zu beurteilen war. Die Analysen zeigten, dass die Keimlingsteile, die gegen einen Widerstand wuchsen, also alle unterirdischen Keimlingsteile, Hypokotyl und Wurzeln, offenbar die zuverlässigsten Triebkraftbeurteilungen zuließen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Keimlinge vom Genotyp SS eine höhere Triebkraft hatten als die Keimlinge der anderen Genotypen, obwohl die Keimfähigkeit bei SS nicht die Höchste war. Im Falle der untersuchten *Cyclamen* bedeutet daher die höchste Keimfähigkeit nicht zwangsläufig auch die höchste Triebkraft.

4.4.3. Einfluss des Kapselalters auf die Samenqualität

Das Alter der Kapsel ist Ausdruck der Bestäubungsreihenfolge, wonach die jüngeren Kapseln die ersten und die älteren Kapseln die letzten Blüten waren, die bestäubt wurden (↑Tab.4).

Ziel war es, herauszufinden, ob die Anzahl der Bestäubungen einen Einfluss auf die Samenqualität ausübt und ob unterschiedliche klimatische Faktoren limitierend wirken (Dornbros 1994, Guttermann 2000). Da die klimatischen Verhältnisse wie Luftfeuchte und Temperatur im Versuch über die gesamte Laufzeit konstant gehalten wurden, war der einzige variable Faktor die Tageslänge und damit die Lichtmenge. Damit sollte eine Einschätzung getroffen werden, inwieweit eine Erhöhung der Biomasseproduktion der Mutterpflanze durch ein Mehrangebot an Licht zur Erhöhung der Samenqualität führt (Susko und Lovett-Doust 1999, 2000). Es kam mit zunehmendem Kapselalter zu einer Steigerung des Samengewichts, der Proteinkonzentration sowie der Saccharosekonzentration. Es ist wahrscheinlich, dass es mit steigendem Lichtangebot, eventuell durch die Erhöhung der Fotosynthese der Mutterpflanze, zu einer Zunahme der Protein- und Saccharosekonzentration kommt. Ebenso wurde damit ein Zusammenhang zwischen Samengewicht und Proteingehalt belegt. Damit kann im Ergebnis festgehalten werden, dass sowohl das Samengewicht als auch die Protein- und Saccharosekonzentration unter mütterlicher Kontrolle stehen. Fraglich ist indes, ob eine Erhöhung dieser Parameter ein Zeichen einer besseren Qualität und Vitalität der Mutterpflanze durch einen möglicherweise effizienteren Stoffwechsel darstellt, oder Zeichen von verzögerter Reife dieser Samen ist. Für Letzteres spricht die erhöhte Saccharosekonzentration in Samen mit zunehmendem Alter. Mit zunehmender Anzahl Kapseln an der Mutterpflanze zeigte sich bezüglich des Samengewichts eine leicht sinkende Tendenz, aber auch das Niveau der Proteinkonzentration stagnierte mit zunehmender Anzahl bestäubter Kapseln an der Mutterpflanze, sodass hier davon ausgegangen wird, dass dies offensichtlich ein Effekt der limitierten Nährstoffverfügbarkeit durch die Mutterpflanze für die Vielzahl Kapseln und Samen ist (Manasse und Stanton 1991, Hossaert und Valero 1988, Melser und Klinkhamer 2001). Derartiges wurde auch bereits bei *Gossypium hirsutum* festgestellt (Karimov und Dontsova 1999).

4.5. Positionseffekte

4.5.1. Pollenschlauchwachstum und Embryosackflächenvergrößerung nach induzierter Bestäubung

Die Tatsache, dass die Pollenschläuche bei *Cyclamen* nach der Bestäubung zuerst die apikalen Samenanlagen und erst später die basal lokalisierten Samenanlagen erreichten begründet, dass auch das Größenwachstum der apikalen Samenanlagen und Embryosäcke zeitiger einsetzte. Dass dies eine notwendige Folge einer stattgefundenen Befruchtung ist, zeigt sich daran, dass die Embryosackflächen zu Anthesebeginn in beiden Positionen eine vergleichbare Größe hatten. Dies wurde auch bei *Lathyrus* beobachtet (Hossaert und Valero 1988). Dass bei *Cyclamen persicum* die Pollenschläuche ca. 4 Tage nach Bestäubung die Samenanlagen erreichen, wurde bereits von Takamura und Myjima (1996) festgestellt und konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Ein wichtiger Faktor dabei ist nicht zuletzt die Vitalität

des Pollens. Sie wird definiert als Fähigkeit der pollengebenden Pflanze Pollen auszubilden, deren generative Kerne durch das Pollenschlauchwachstum den Embryosack erreichen können (Knox et al. 1986). Die Unterschiede bezüglich der Pollenvitalität der einzelnen Genotypen in den eigenen Untersuchungen waren jedoch gering. Neben der Vitalität der Pollenkörner ist aber auch der Konkurrenzkampf der Pollenschläuche um die vorhandenen Samenanlagen ein entscheidender Faktor. Je ungleicher dabei das Verhältnis der Pollenschläuche zu den vorhandenen Samenanlagen ist, umso größer ist der Konkurrenzkampf (Erbar 2003, Baker und Shore 1995, Plitmann 1993). Das heißt, dass die Vielzahl der Pollenschläuche aufgrund der zahlenmäßig geringeren Samenanlagen einem großen Konkurrenzdruck unterworfen sind, denn gewöhnlich wächst beim Vorgang der Befruchtung nur ein Pollenschlauch in eine Samenanlage ein. Dieser verhindert danach das Einwachsen weiterer Pollenschläuche (Russel 1996, Diaz-Pontones 2000, Herrero und Hormaza 1996, Wang et al. 2002). In den eigenen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass jeweils nur ein Pollenschlauch in eine Samenanlage einwuchs. In der Literatur wird des Weiteren allgemein der Standpunkt vertreten, dass die schnellsten Pollenschläuche zunächst die am besten erreichbaren Samenanlagen befruchten. Dies sind zumeist die Samenanlagen am stylaren Ende der Plazenta (Lau und Stephenson 1993, Guitierrez et al. 1996).

Damit ist im Ergebnis festzuhalten, dass bei *Cyclamen* die apikal lokalisierten Samenanlagen in Bezug auf die Befruchtung einen Vorteil gegenüber den basalen Samenanlagen hatten. Dieser Vorteil zeigte sich auch im früheren Einsetzen der Samenentwicklung, welches sich in der Zunahme der Embryosackfläche äußerte. Fraglich ist jedoch in diesem Zusammenhang, ob sich dieser Vorteil in der folgenden weiteren Samenentwicklung fortsetzt und sich auch in der Samenqualität äußert.

4.5.2. Samenentwicklung

Nachdem die Befruchtung und damit die Entwicklung, zumindest die Größenzunahme, der Samenanlagen in der apikalen Position zeitlich früher einsetzte als bei den basalen Samenanlagen, zeigte sich im weiteren Verlauf der Samenentwicklung bereits ab einem Zeitpunkt von 32 Tagen nach der Bestäubung, dass die basalen Samenanlagen einen höheren Anteil triploiden Endosperms und darüber hinaus auch eine höhere mitotische Aktivität aufwiesen als die apikalen Samenanlagen. Da wie bereits erwähnt die Mitoseaktivität und der Status der Endospermentwicklung gute Marker zur Beurteilung des Reifestadiums des Samens sind (Sliwiska 2000) ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse davon auszugehen, dass die Samenanlagen an einer Plazenta und darüber hinaus die Samen einer Kapsel in unterschiedlichen Reifestadien vorlagen. Aus den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen lässt sich schließen, dass die basalen Samenanlagen aufgrund der höheren mitotischen Aktivität bis 63 Tagen nach der Bestäubung weniger weit entwickelt waren als die apikalen Samenanlagen. Den Entwicklungsvorsprung, den die apikalen Samenanlagen durch die frühere Befruchtung hatten, konnten sie demnach bis zu einem Zeitpunkt von 63 Tagen nach

Anthesebeginn behaupten. Danach kam es sowohl in den apikalen, als auch in den basalen Samenanlagen zu einer deutlichen Reduktion der mitotischen Aktivität.

Auch in Bezug auf die Endospermibildung zeigte sich das eben bereits Gesagte. Die basalen Samenanlagen generierten während der Samenentwicklung deutlich mehr Endosperm als die Apikalen. Jedoch waren auch hier zu einem Zeitpunkt von 63 Tagen nach Bestäubung, also dem Zeitpunkt der beginnenden Samenreife, die Anteile des Endosperms zwischen den apikalen und basalen Samenanlagen vergleichbar. Dies bedeutet im Ergebnis, dass die basalen Samenanlagen entweder bis zu diesem Zeitpunkt ihren Nachteil aufholten und damit eine im Vergleich zu den apikalen Samenanlagen schnellere und effizientere Entwicklung vollzogen, oder dass die Entwicklung der apikalen Samenanlagen ab diesem Zeitpunkt stagnierte. Derartige positionsabhängige Reifeverläufe der Samen wurden bereits bei *Hormathophylla spinosa* (Gomez und Zamora 2003), *Lathyrus maritimus* (Gurusamy und Bal 2000), *Hyacinthoides nonscripta* (Corbet 1998), *Ulex europaeus* und *Ulex gallii* (Guterrez et al. 1996), *Phaseolus coccineus* (Rocha und Stephenson 1991) sowie *Hibiscus esculentus* (Chandra und Bhatnagar 1974) beschrieben, wonach sich vermehrt Samenanlagen einer bestimmten Position zu reifen Samen entwickelten. Es wurde dabei nachgewiesen, dass nach dem Abtrennen der begünstigten Samenanlagen im Experiment sich daraufhin die unter normalen Bedingungen benachteiligten Samenanlagen weiter zu reifen Samen entwickelten (Rocha und Stephenson 1991, Susko und Lovett-Doust 1999). In der Literatur wird die so genannte effektive Architektur Hypothese vertreten, nach der bestimmte intrinsische Faktoren die Reifung der Samenanlagen zu reifen Samen in bestimmten Positionen limitieren (Diggle 1995). Einer der Faktoren wird vor allem in der Kontrolle durch die Mutterpflanze gesehen, genauer in der durch sie limitierten Nährstoffverfügbarkeit (Katepa Mupondwa 1996, Bennett et al. 2003, Fenster 1991). Dies äußert sich auch im weiteren Verlauf der Entwicklung, im Gehalt der Inhaltsstoffe sowie im Samengewicht.

4.5.3. Samenqualität

4.5.3. 1. Samengewicht

Im Verlauf der Untersuchungen konnten deutliche Positionseffekte in Bezug auf das Samengewicht festgestellt werden. Die basalen Samen waren regelmäßig schwerer als die apikalen Samen. Diese positionsabhängigen Unterschiede im Samengewicht wurden bei verschiedenen Gattungen bereits mehrfach beschrieben. So bei *Stropostyles helvola* (Yanful und Maun 1996), *Medicago sativa* (KatepaMupondwa 1996), *Euphorbia characias* (Espadaler und Gomez 2001), *Sesamum indicum* (Tashiro et al. 1991, Brar 1977), *Ulex* sp. (Guterrez et al. 1996), *Trifolium repens* (Marshall et al. 1996) und *Zea mays* (Batistella et al. 2002). Nach Nakamura (1988) ist das Samengewicht in der Position meist höher, in der auch die größte Wahrscheinlichkeit der Samenreifung in der Kapsel

besteht. Susko und Lovett-Doust (2000) stellten fest, dass das Samengewicht geringer wird, je weiter der Samen vom Hauptstamm entfernt ist.

4.5.3. 2. Inhaltsstoffe im Samen

Auch die positionsabhängigen Unterschiede in der Kohlenhydrat- und Proteinkonzentration sowie der Lipiddichte im Samen ist bei einigen Pflanzen bereits in ähnlicher Form beschrieben worden. So fand man bei *Glycine max* bei apikalen Samen einen höheren Protein- und niedrigeren Ölgehalt, als in basalen Samen (Bennett et al. 2003). Bei *Sesamum indicum* war der Ölgehalt dagegen in den apikalen Samen höher (Tashiro et al. 1991).

In der Literatur wird die Hypothese vertreten, dass die Samenanlagen am stylaren Ende zwar bei der Befruchtung einen Vorteil haben, jedoch beim Befüllen der Samen mit Speicherstoffen ist die Samenanlage im Vorteil, die in der Nähe der Nahrungsquelle ist (Gutierrez et al. 1996). Die eigenen Untersuchungen an *Cyclamen persicum* stützen diese Hypothese.

In Bezug auf den bereits erwähnten Zusammenhang zwischen Saccharosekonzentration und Mitoseaktivität sowie Proteingehalt und DNA-Gehalt zum Reifestadium des Samens (Peak et al. 1997, Moreno et al. 2003), kann somit auch belegt werden, dass die basalen Samen gegenüber den apikalen Samen 63 Tage nach der Bestäubung und zum Zeitpunkt der Ernte deutlich reifer sein mussten. Sie hatten eine niedrigere Saccharosekonzentration und wiesen gleichzeitig eine höhere Proteinkonzentration auf als die apikalen Samenanlagen. Der niedrigere Status der Saccharosekonzentration weist hierbei offensichtlich auf eine fortgeschrittene Biosynthese der Reservestoffe im Samen hin. Dies kumuliert mit der Reife eines Samens.

Wenn man also davon ausgehen kann, dass ein Stagnieren der Mitoseaktivität mit einer Reduktion der Saccharosekonzentration verbunden ist und dies als Zeichen der Samenreife gewertet wird (Rediske 1969, Weber et al. 1997), so lassen die vorliegenden Ergebnisse darauf schließen, dass zum Zeitpunkt der Einstellung der Mitoseaktivitäten die Samenreife bei den apikalen Samen noch nicht vollständig erreicht war. Denn trotz deutlich reduzierter Mitoseaktivität der apikalen Samen (63 Tage nach der Bestäubung) lag dennoch eine deutlich erhöhte Saccharosekonzentration im Samen vor. Auch die Tatsache, dass in den apikalen Samen die Proteinkonzentration geringer war als in den basalen Samen, spricht für diese Annahme.

In Anbetracht der positionsabhängigen Unterschiede der Lipiddichte im Samen und der Tatsache, dass Lipide offenbar als wichtige Speichersubstanz für die Lagerung des Samens sowie die späteren Entwicklungsprozesse des Keimlings fungieren (Mayer und Poljakoff-Mayber 1988), kommt man zu der Schlussfolgerung, dass hier die basalen Samen gegenüber den apikalen Samen eine deutlich höhere Qualität und Vitalität besitzen. Wahrscheinlich steht auch der Lipidgehalt im Zusammenhang mit der mütterlichen Nährstoffverfügbarkeit (Xu et al. 2002). In Bezug auf den Entwicklungs- bzw. Reifestatus des Samens könnte ein hoher Lipidgehalt und eine gleichzeitige Reduktion der Saccharosekonzentration wiederum Zeichen einer fortgeschrittenen Samenreife sein, denn wie bereits

erwähnt, ist es denkbar, dass *Cyclamen* bei der Keimung der Samen auf die Lipide im Endosperm als Reservesubstanz zurückgreifen. Biochemisch ist dabei die Saccharose der Hauptlieferant des Kohlenstoffs für die Lipidsynthese (Wallis et al. 1999). Auch dies belegt, dass die basalen Samen zum Zeitpunkt der Ernte reifer waren als die apikalen Samen.

In den eigenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass mit zunehmendem Kapselalter die Saccharosekonzentration im Samen stieg. Dies konnte bei beiden Positionen in gleicher Weise festgestellt werden. Hinsichtlich der Proteinkonzentration zeigte sich jedoch, dass mit zunehmendem Kapselalter eine höhere Proteinkonzentration in den apikalen Samen vorhanden war als in den basalen Samen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Störungen bei der Samenbefüllung infolge des limitierten Nahrungsangebots durch die Mutterpflanze. Die Unterschiede waren jedenfalls statistisch nicht gesichert.

4.5.3. 3. Keimfähigkeit und Triebkraft

Wie zu erwarten war, zeichneten sich die zuvor beschriebenen Positionseffekte in gleicher Weise hinsichtlich der Keimfähigkeit und Triebkraft ab. In allen Versuchen keimten die basalen Samen besser als die apikalen Samen. Dieses Phänomen wurde auch bei anderen Gattungen beschrieben. So bei *Euphorbia characias* (Espadaler und Gomez 2001), *Solanum tuberosum* (Pallais 1995), *Agrostis curtisii* und *Avenula marginata* (Gonzalezrabanal et al. 1994), *Mesembryanthemum nodiflorum* (Guttermann 1994), *Hyacinthoides nonscripta* (Corbet 1998), *Coincya* sp. (Herranz et al. 2003) *Glycine max* (Adam et al. 1989), *Capparis spinosa* (Pasqual et al. 2002) *Medicago* und *Xanthium* (Mayer und Poljakoff-Mayber 1988).

Wie bereits erwähnt wird die Keimung der Samen von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wie z.B. dem Samengewicht (Lee und Lee 1986), welches durch die limitierte Nährstoffverfügbarkeit unter mütterlicher Kontrolle steht, dem Reifegrad des Samens (Corbineau et al. 1989 a, b) und der Inhaltsstoffverfügbarkeit des Samens. Auch der DNA-Gehalt im Samen ist dabei von Bedeutung, denn er kann als Reserve von Nukleosiden und Phosphatiden für den Embryo während der Keimung dienen (Dhillon und Miksche 1982, Millerd und Spencer 1974). In Bezug auf die positionsabhängigen Unterschiede in der Keimfähigkeit kann daher Folgendes festgestellt werden. Die Unterschiede sind Ausdruck der unterschiedlichen mittleren Einzelsamengewichte und der verschiedenen Reifegrade der Samen verbunden mit der unterschiedlichen Inhaltsstoffverfügbarkeit im Endosperm.

Dabei korreliert eine bessere Keimfähigkeit der basalen Samen mit einem höheren Samengewicht, der fortgeschrittenen Samenreife und dem Mehrangebot an Inhaltsstoffen.

Die Ergebnisse zur positionsabhängigen Triebkraft der Keimlinge offenbarten die gleichen Effekte wie bei der Keimfähigkeit der Samen in Abhängigkeit zur Position in der Kapsel. Die Triebkraft der basalen Samen war gegenüber den apikalen Samen deutlich besser. Auch hier führte das höhere Samengewicht, die fortgeschrittene Samenreife sowie die höhere Inhaltsstoffakkumulation im

Endosperm zu einer höheren Triebkraft. Bei *Solanum tuberosum* hatten ebenfalls die basalen Samen aufgrund dessen, dass sie mehr Speicherstoffe akkumulierten, eine höhere Triebkraft (Pallais 1995).

4.6. Beziehungen zwischen Samenanlagenqualität und Samenqualität

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wurden die bereits beschriebenen Samenanlagenmerkmale Embryosackheterogenität, Calloseeinlagerung und Abweicher bei der Calloseeinlagerung als Samenanlagenqualitätsparameter klassifiziert. Ziel der Untersuchungen war es, einen Zusammenhang zwischen den genannten Samenanlagenqualitätsparametern und der Samenqualität zu erkennen, um künftig ausgehend von den Samenanlagenmerkmalen Prognosen über den zu erwartenden Samenertrag und der Samenqualität treffen zu können.

Zunächst fiel auf, dass sich aus der Vielzahl der an einer Plazenta zur Verfügung stehenden Samenanlagen nur ein Bruchteil zu reifen Samen entwickelte. So entwickelten sich bei den diploiden Genotypen nur ca. 20 % der Samenanlagen, bei dem Genotyp TK sogar nur 13 % zu reifen Samen. Die Absterberate beträgt hier also 75 bis 80 %. Dieses Phänomen ist auch in der Literatur beschrieben worden. So entwickelt sich bei *Melilotus officinalis* von acht Samenanlagen nur eine zu einem reifen Samen (Akhalkatsi et al. 1999), bei *Prunus armeniaca* entwickelt sich von zwei Samenanlagen nur eine (Rodrigo und Herrero 1997), so auch bei *Quercus suber* (Boavida et al. 1999), bei *Hormatophylla spinosa* beträgt der Anteil reifer Samen aus den vorhandenen Samenanlagen gewöhnlich weniger als 50% (Gomez und Zamora 2003). Es wird davon ausgegangen, dass das Absterben mütterlicherseits gesteuert wird (Akhalkatsi et al. 1999, Karkkainen et al. 1999), u.a. durch einen Mangel an verfügbaren Nährstoffen (Stephenson 1981). Daneben gilt auch Samenanlagensterilität als ein Hauptgrund für einen schlechten Samenertrag, wie dies bei *Trifolium repens* nachgewiesen werden konnte (Thomas 1996). Vielfach wird auch ein Zusammenhang zwischen anomaler Samenanlagenentwicklung und damit missgebildeten Embryosäcken und einem schlechten Samenertrag gesehen (Oryol und Kazachkovskaya 1991, Eaton und Jamont 1964). Ein derartiger Zusammenhang wurde auch im Rahmen der eigenen Untersuchungen gefunden. Mit zunehmender Homogenität der Embryosäcke der Samenanlagen an einer Plazenta war auch der Samenertrag höher, wohingegen ein niedriger Samenertrag mit einer hohen Heterogenität der Embryosäcke korrelierte. Möglicherweise ist dies Ausdruck der Vitalität und damit Qualität der Mutterpflanze. Weiterhin gab es einen Zusammenhang zwischen der Stärke der Calloseeinlagerung und dem Samenertrag. Ähnlich wie bei der Embryosackheterogenität könnte auch dies wiederum ein Zeichen der Qualität der Mutterpflanze sein. Dies lässt darauf schließen, dass eine hohe Qualität der Mutterpflanze gleichzeitig eine vermehrte Nährstoffverfügbarkeit für die sich entwickelnden Samen und Samenanlagen bedeutet. Das wiederum schlägt sich im Samenertrag nieder. Auch die Korrelation der Abweicher aus der Callosebonitur mit dem Samenertrag stützt diese Behauptung, dass im Ergebnis gesagt werden kann, dass die Fähigkeit einer Mutterpflanze zum einen viele Samenanlagen anzulegen, ein Ausdruck der Vitalität der Mutterpflanze ist. Dies kann gemessen und prognostiziert werden, am Vorhandensein

eventueller Störungen in der Samenanlagen- bzw. Samenentwicklung, welche sich anhand der Parameter Embryosackheterogenität, Calloseeinlagerung in den Samenanlagen und Abweichen bei der Calloseeinlagerung zuverlässig beurteilen lassen.

Zwischen den Samenanlagenparametern Calloseeinlagerung und Embryosackheterogenität und den Samenqualitätsmerkmalen Samengewicht, Proteingehalt, Keimfähigkeit und Triebkraft konnten keine engen Beziehungen gefunden werden. Damit lassen sich bei *Cyclamen persicum* die genannten Qualitätsmerkmale der Samen nicht aus den ausgewählten Samenanlagenqualitätsparametern vorhersagen. Das bedeutet, dass die Samenqualität offenbar erst später beeinflusst wird.

Wie allerdings in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, erlauben aber die Parameter Samenanlagenanzahl, Embryosackheterogenität, Calloseeinlagerung in den Samenanlagen und Abweicher bei der Calloseeinlagerung zuverlässige Prognosen über den zu erwartenden Samenertrag bei den untersuchten Genotypen von *Cyclamen persicum*.

4.7. Beziehungen zwischen den Samenparametern mit Keimfähigkeit und Triebkraft

Untersucht wurde eine mögliche Beziehung zwischen Samengewicht, Keimfähigkeit und Triebkraft sowie Proteingehalt im Samen. Dabei wurde bei allen diploiden Genotypen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Samengewicht und dem Proteingehalt im Samen mit der Triebkraft der Samen festgestellt.

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen Proteingehalt und Triebkraft gilt das bereits Festgestellte, wonach eine hohe Konzentration an Proteinen eine fortgeschrittene Reife der Samen bedeutet, welche sich wiederum begünstigend auf die Triebkraft auswirkt (Corbineau et al. 1989 a, b). Darüber hinaus bedeutet eine hohe Proteinkonzentration im Samen ebenfalls ein großes Angebot an Nahrungs- und Stoffwechselressourcen für den sich entwickelnden Keimling, welches sich im stärkeren Wachstum der unterirdischen Keimlingsteile niederschlägt. Wie bereits erwähnt ist das spezifische Samengewicht offenbar Ausdruck mütterlicher Kontrolle und Einfluss durch die optimale Versorgung mit den zur Verfügung stehenden Nährstoffressourcen durch die Mutterpflanze.

Schwerere Samen, die im Verlauf ihrer Entwicklung von der Mutterpflanze besser versorgt wurden, besitzen demnach eine höhere Triebkraft als leichtere Samen, welche in der Versorgung benachteiligt wurden (Baloch et al. 2001).

Auch der starke Zusammenhang zwischen Samengewicht und Proteingehalt im Samen spricht für die Annahme, dass dies Ausdruck der Versorgung durch die Mutterpflanze ist. Im Umkehrschluss und unter Zugrundelegung der Tatsache, dass ein hoher Proteingehalt Zeichen fortgeschrittenen Samenreife ist, bedeutet dies demnach auch, dass ein höheres Samengewicht ebenso als Zeichen fortgeschrittener Reife gewertet werden kann. Wobei das höhere Samengewicht nicht auf den erhöhten Anteil Endosperm zurückzuführen ist, wie die positionsabhängigen flowcytometrischen Untersuchungen zur Samenentwicklung belegen, sondern wahrscheinlich durch das Mehrangebot an Reservestoffen im Endosperm zustande kommt. Dies impliziert jedoch, dass gleichzeitig mit einem

hohen Samengewicht und einem hohen Proteingehalt im Samen auch die Keimfähigkeit dementsprechend gleichermaßen hoch wäre (Lee und Lee 1986). Die vorliegenden Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen können dies jedoch in der Form nicht für alle Genotypen bestätigen. Die engen Korrelationen von Proteingehalt, Samengewicht und Keimfähigkeit bei den Genotypen SK und SS zeigten sich bei der SP nicht. Die Ursachen hierfür sind unklar. Obgleich statistisch nicht gesichert, zeigte sich aber auch bei der SP im Verlauf der Untersuchungen, insbesondere in den Untersuchungen zu den Positionseffekten, diese Tendenz, sodass auch hier die schwereren Samen besser keimten als die leichteren, und dass auch die Samen, bei denen die Proteinkonzentration höher war, ebenfalls besser keimten. Demnach konnte auch bei der SP, wenn auch nur tendenziell, ein Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt, dem Samengewicht und der Keimfähigkeit der Samen erkannt werden.

Im Ergebnis und unter Beachtung der anderen Samenqualitätsparameter wie Kohlenhydratkonzentration und Lipiddichte lässt sich damit im Ergebnis bei *Cyclamen persicum* feststellen, dass ein höheres Samengewicht, verbunden mit einer hohen Proteinkonzentration sowie hoher Lipiddichte und gleichzeitiger niedriger Saccharosekonzentration im Samen zu einer hohen Keimfähigkeit und hohen Triebkraft führt. Dabei resultiert die genannte Komposition des Samens aus einer Kombination von fortgeschrittener Reife des Samens und der besseren Versorgung mit Nahrungsressourcen durch die Mutterpflanze, welche begünstigend auf den Reservestoffwechsel des Samens wirkt, was wiederum zu der erhöhten Keimfähigkeit und Triebkraft führt.

4.8. Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit den durchgeführten Untersuchungen an den genannten Genotypen von *Cyclamen persicum* konnte gezeigt werden, dass der Samenertrag bereits auf frühen Stufen der Samenanlagenentwicklung präterminiert ist. Demzufolge ist hierfür in besonderem Maß die Qualität und Vitalität der Mutterpflanze von Bedeutung, denn je höher die Qualität der Mutterpflanze ist, umso mehr erhöht sich das für die Samenanlagen zur Verfügung stehende Nahrungsangebot. Darüber hinaus zeigt sich die Qualität der Mutterpflanze ebenfalls in den untersuchten Samenanlagenparametern, Embryosackheterogenität, Calloseeinlagerung und Abweicher bei der Calloseeinlagerung. Diese Parameter eignen sich folglich dazu, die Qualität der Mutterpflanze zu beurteilen. Bezüglich der inneren Qualität der Samen lässt sich im Ergebnis feststellen, dass die Konzentration der löslichen Proteine ein genotypspezifisches Maß darstellt. In Bezug auf die Portionierung der untersuchten Inhaltsstoffe im Endosperm stellen die Lipide gegenüber den Proteinen die weitaus stärkste Fraktion dar. Diese Tatsache, und der Umstand, dass im Cyclamensamen keine Stärke vorhanden ist, impliziert die Behauptung, dass die Lipide als Hauptreservesubstanz für die Keimung des Samens zur Verfügung stehen. Hinsichtlich der Beurteilung des Reifegrads des Samens kann bei *Cyclamen persicum* die Saccharosekonzentration in Kombination mit der Konzentration löslicher Proteine sowie der Messung der Zellteilungsaktivität als aussagekräftiges Maß herangezogen werden. Die erwähnten

Positionseffekte der Samen innerhalb einer Kapsel sind ein Phänomen das so in dieser Form bei allen untersuchten Genotypen festgestellt werden konnte. Es konnte ganz deutlich gezeigt werden, dass die apikalen Samenanlagen zwar bei der Befruchtung und damit beim Zeitpunkt des Beginns der Samenentwicklung Vorteile haben, aber bei der Samenreifung und Akkumulation der Samenreservestoffe gegenüber den basalen Samen im Nachteil sind. Aufgrund der räumlichen Nähe der basalen Samen zum Blüten- bzw. Fruchtsiel sind diese bei der Versorgung durch die Mutterpflanze begünstigt. Dieser Vorteil offenbart sich im weiteren Verlauf der Samenentwicklung in der fortgeschrittenen Reife der Samen sowie im höheren Samengewicht, der höheren Keimfähigkeit und der besseren Triebkraft.

In Bezug auf die Beurteilung der Keimfähigkeit und der Triebkraft kann die Konzentration der löslichen Proteine herangezogen werden, wobei zuvor die genotypspezifische Konzentration bestimmt werden muss. Zur Erhöhung der Samenqualität könnten bei besserer Versorgung der Mutterpflanze mehr Samen in einer Kapsel optimal versorgt werden. Durch die bessere Versorgung der Mutterpflanze beispielsweise durch eine erhöhte N-Düngung könnte es zu einer Angleichung und Verbesserung der Qualität basaler und apikaler Samen kommen. Denkbar wären hier auch geeignete Maßnahmen zur Erhöhung der Fotosynthese der Mutterpflanze. Darüber hinaus ist auch zu erwarten, dass die Samenanlagenqualität zunimmt. Dies würde sich in der Erhöhung des Samenertrags äußern. Weiterhin müsste in folgenden Untersuchungen geklärt werden, inwieweit zum einen die Jahreszeit und zum anderen das Alter der Mutterpflanze einen Einfluss auf Samenertrag und Samenqualität ausüben.

5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit liefern einen Beitrag zur Ursachenfindung für Samenertrags- sowie Samenqualitätsunterschiede bei *Cyclamen persicum*. Es wurden 4 Genotypen von *Cyclamen persicum* untersucht. Neben dem Gewinn von grundlegenden anatomisch-morphologischen Erkenntnissen zum Aufbau der Samenanlagen standen vor allem die Samenentwicklung und die Samenqualität im Vordergrund. Es sollte geklärt werden, inwieweit ausgewählte Samenanlagenparameter geeignet sind, den späteren Samenertrag und die Qualität der Samen zu beeinflussen oder zu prädeteminieren. Dabei stand die Nutzung der Parameter für eine Prognose der Saatgutqualität im Vordergrund.

Die Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Die anatomisch-morphologischen Untersuchungen zum Aufbau der Samenanlagen zeigten, dass diese als hemianatroper Typ zu klassifizieren sind. Des Weiteren wurde die genaue Struktur der Mikropyle mit einem Obturator beschrieben. Diese Strukturen stehen offenbar in Verbindung mit dem Pollenschlauchwachstum. Dies konnte durch eigene Untersuchungen bestätigt werden.
2. In Bezug auf die Samenentwicklung wurde festgestellt, dass die Teilung der Megasporenmutterzelle drei Tage vor Anthesebeginn in allen Samenanlagen an einer Plazenta synchron erfolgt.
3. Als erstes Anzeichen für Unterschiedlichkeiten zwischen den Samenanlagen einer Plazenta wurde die Heterogenität der Embryosäcke zu Anthesebeginn analysiert. Sie ist wahrscheinlich Ausdruck von Entwicklungsunterschieden der Samenanlagen einer Plazenta oder erstes Anzeichen von Degeneration. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass das Ausmaß der Heterogenität ein Zeichen der Qualität der Mutterpflanze als Samenträger ist.
4. Es wurde ein zeitlicher Verlauf der Calloseeinlagerung in den Samenanlagen festgestellt. Dies wurde bewertet als ein für die Befruchtung der Samenanlagen notwendiges Ereignis, in der Form, dass hierbei die Callose als Pollenschlauchattraktant fungiert. Dies konnte durch die Anreicherung von Callose im Bereich des Obturators und des Mikropylkanals bestätigt werden. Nach erfolgter Befruchtung, ab einem Zeitpunkt von ca. 5 Tagen nach Anthesebeginn, zeigte sich ein Rückgang der Calloseeinlagerung.
5. Als weiterer Chemoattraktant für das Pollenschlauchwachstum fungiert intrazelluläres Calcium. Es wurde nach induzierter Bestäubung vor allem im Bereich der Mikropyle und im

Bereich des Embryosacks gefunden. Darüber hinaus zeigt sich auch hier deutlich ein zeitlicher Verlauf bezüglich Zu- und Abnahme der Calciumakkumulation.

6. Nach induzierter Bestäubung erreichten die Pollenschläuche nach 3 bis 4 Tagen die Plazenta und wuchsen direkt in die Samenanlagen ein. Daraufhin setzte durch das Anwachsen des Endosperms das Größenwachstum der Embryosäcke ein. Die mitotischen Aktivitäten der Samenentwicklung waren bis ca. 63 Tage nach Bestäubung nachweisbar. Danach kam es zum deutlichen Rückgang der Zellteilungsprozesse.
7. Die Inhaltsstoffakkumulation im Samen wurde als „innere Qualität“ definiert. Bezüglich der Kohlenhydratkonzentration wurde festgestellt, dass die Saccharose die weitaus stärkste Fraktion der Kohlenhydrate darstellt. Glucose und Fructose kommen dagegen nur in geringer Menge vor. Der Saccharose-, Glucose- und Fructosegehalt nahm mit zunehmender Samenreife ab. Die Analyse der löslichen Proteine erbrachte die Erkenntnis, dass die Proteinkonzentration ein genotypabhängiges Maß ist. Die Lipiddichte im Endosperm war höher als die Proteindichte. Wahrscheinlich fungieren die Lipide als Reservesubstanz für die Keimung. Stärke wurde nicht gefunden.
8. Durch die Modifizierung der Methode der quantitativen Analyse der löslichen Proteine war es möglich, die Analysen an Einzelsamen zerstörungsfrei durchzuführen, sodass sie für folgende Untersuchungen noch zur Verfügung stehen konnten.
9. Mittels planimetrischer Analyse gelang es, die Dichte der ausgewählten Sameninhaltsstoffe Proteine und Lipide (unspezifisch) durch Lichtmikroskopie zu bestimmen.
10. Für die Bewertung des Samenertrags wurde eine neue Formel zur Berechnung erarbeitet, wobei der Gesamtertrag, den Samenertrag je Pflanze unter Berücksichtigung der biologischen Selektion bzw. der Konkurrenz der Samenanlagen untereinander und der Vitalität und damit der Qualität der Mutterpflanze betrachtet. Bei den diploiden Genotypen entwickelten sich im Mittel nur ca. 20% der vorhandenen Samenanlagen zu reifen Samen, beim tetraploiden Genotyp sogar nur 13%.
11. Keimfähigkeit und Triebkraft variierten auf den verschiedenen Nährmedien erheblich. Als Maß für die Triebkraftbeurteilung wurden die unterirdischen Teile des Keimlings gemessen. Dabei zeigte sich, dass derjenige Genotyp mit der höchsten Keimfähigkeit nicht zwangsläufig auch die höchste Triebkraft hatte.

- 12.** Samenanlagen und Samen an unterschiedlichen Positionen in der Plazenta bzw. in der Kapsel wiesen zum Teil erhebliche Unterschiede in der Samenanlagen- und Samenqualität auf. Auch die Samenentwicklung in Abhängigkeit zur Position erfolgte in unterschiedlicher Weise. Die Samenentwicklung der apikalen Samenanlagen begann aufgrund der zeitigeren Befruchtung eher als die der basalen Samenanlagen. Im weiteren Verlauf der Samenentwicklung holten die basalen Samenanlagen das anfängliche Entwicklungsdefizit wieder auf und hatten am Ende der mitotischen Zellteilungsprozesse 63 Tage nach Bestäubung sogar einen höheren Anteil Endosperm als die apikalen Samenanlagen.

Die basalen Samen hatten einen deutlich niedrigeren Gehalt sowohl an Saccharose, als auch an reduzierten Zuckern, was darauf schließen lässt, dass die basalen Samen in ihrer Entwicklung weiter fortgeschritten und damit reifer waren als die apikalen Samen. Die basalen Samen besaßen auch eine höhere Proteinkonzentration und Lipiddichte. Darüber hinaus hatten die basalen Samen ein höheres Samengewicht als die Apikalen. Außerdem waren bei den basalen Samen sowohl die Keimfähigkeit als auch die Triebkraft deutlich besser als bei den apikalen Samen.

- 13.** Die basalen Samen waren daher im Ergebnis reifer und qualitativ besser als die apikalen Samen.

- 14.** Folgende Beziehungen wurden festgestellt: Die Embryosackheterogenität korrelierte mit der Stärke der Calloseeinlagerung sowie der Anzahl Abweicher bei der Calloseeinlagerung. Je homogener die Embryosäcke der Samenanlagen an einer Plazenta ausgebildet waren, umso stärker war die Calloseeinlagerung und umso geringer war die Anzahl Abweicher. Das lässt darauf schließen, dass eine geringe Embryosackheterogenität und eine starke Calloseeinlagerung, verbunden mit wenig Abweichern eine hohe Qualität und Vitalität der Mutterpflanze bedeutet. Weiterhin konnte eine Beziehung zwischen der Embryosackheterogenität, der Calloseeinlagerung bzw. Abweichern mit dem Samenertrag festgestellt werden. Je homogener die Embryosäcke der Samenanlagen einer Plazenta ausgebildet waren, umso höher war der Samenertrag, und je stärker die Calloseeinlagerung war, sowie je geringer die Anzahl Abweicher war, umso höher war auch hier der Samenertrag. Dies stützt die Annahme, dass die Parameter Embryosackheterogenität, Calloseeinlagerung und Abweicher geeignet sind, die Qualität und Vitalität der Mutterpflanze zu kennzeichnen.

- 15.** Positive Korrelationen zwischen dem Samengewicht und der Keimfähigkeit sowie der Triebkraft wurden festgestellt.

Weiterhin konnte eine Beziehung zwischen der Proteinkonzentration, der Keimfähigkeit und Triebkraft festgestellt werden. Offenbar sind eine hohes Samengewicht und eine hohe

Proteinkonzentration im Samen Zeichen von fortgeschrittener Reife des Samens. Dies wiederum begünstigt sowohl die Keimfähigkeit, als auch die Triebkraft der Samen.

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse wurden Zusammenhänge zwischen den ausgewählten Samenanlagenparametern und dem Samenertrag bei *Cyclamen persicum* nachgewiesen. Dies zeigt, dass der Samenertrag bei *Cyclamen persicum* bereits auf der Stufe der Samenanlagen prädestiniert ist. Die dargestellten Positionseffekte auf innere und äußere Qualität der Samen lassen weiterhin darauf schließen, dass ein limitiertes Nahrungsangebot innerhalb der Mutterpflanze vorliegt, und die damit verbundene Konkurrenzsituation der Samenanlagen untereinander um die zur Verfügung stehenden Nährstoffressourcen zu den genannten Unterschieden führt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Qualität und Vitalität der Mutterpflanze entscheidend für die Qualität der Samenanlagen und darüber hinaus für den zu erwartenden Samenertrag und die Samenqualität ist. Ebenso ist die Samenqualität abhängig vom verwendeten Genotyp.

6 Literaturverzeichnis

- Adam, N., McDonald, M. Jr., Henderlong, P. (1989)** The influence of seed position, planting and harvesting dates on soybean seed quality. *Seed Sci Technol* 17 (1): 143-152
- Aderkas, P von, Leary, C. (1998)** Micropylar exudates in Douglas fir – timing and volume of production. *Sex Plant Reprod* 11 (6): 354-356
- Akhalkatsi, M., Pfauth, M., Calvi, Cl. (1999)** Structural aspects of ovule and seed development and non-random abortion in *Mellilotus officinalis* (Fabaceae). *Protoplasma* 208(1-4): 211-223
- Albuquerque N., Burgos L., Egea J. (2002)** Variability in the developmental stage of apricot ovules at anthesis and its relationship with fruit set. *Ann App Bio* 141 (2): 147-152
- Al-Karaki, GN., Ereifej, KI. (1999)** Relationships between seed yield and chemical composition of field peas grow under semi-arid Mediterranean conditions. *J Agron Crop Sci* 182 (4): 279-284
- Amor, Y., Haigler, C., Johnson, S., Wainscott, M., Delmer, D. (1995)** A Membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92 (20): 9353-9357
- Antoine, A.F., Dumas, C., Faure, J.E., Feijo, J.A. (2001)** Egg activation in flowering plants. *Sex Plant Reprod* 14: 21-26
- Appenroth, K.-J., Augsten, H., Liebermann, B., Feist, H. (1982)** Effects of light quality on amino acid composition of proteins in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. Using a specially modified Bradford method. *Biochem Physiol Plant* 177: 251-258
- Arbeloa, A., Herrero, M. (1987)** The significance of the obturator in the control of pollen tube entry into the ovary in peach (*Prunus persica*). *Ann Bot* 60 (6): 681-685
- Bai, Y., Tischler, C.R., Booth, D.T., Taylor Jr., E.M. (2003)** Variations in germination and grain quality within a rust resistant common wheat germplasm as affected by parental CO₂ conditions. *Env Exp Bot* 50 (2): 159-168
- Bailly, C., Audigier, C., Ladonne, F., Wagner, M., Coste, F., Corbineau, F., Come, D. (2001)** Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *J Exp Bot* 52 (357): 701-708
- Baker, K., Richards, A.J., Tremayne, M. (1994)** Fitness constraints on flower number, seed number and seed size in the dimorphic species *Primula farinosa* L. and *Armeria maritima* (Miller) Willd. *New Phytologist* 128 (3): 563-570
- Baker AM., Shore JS. (1995)** Pollen competition in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Am J Bot* 82(6): 717-725
- Baloch, H.A., DiTommaso, A., Watson, A.K. (2001)** Intrapopulation variation in *Abutilon theophrasti* seed mass and its relationship to seed germiability. *Seed Sci Res* 11 (4): 335-344
- Batistella, F., Vitti Moro, F., De Carvalho, N. (2002)** Relationships between physical, morphological, and physiological characteristics of seeds developed at different positions of the ear of two maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Seed Sci Technol* 30: 97-106

- Bautista-Calles, F., Acosta-Zamudio, C., Vidal-Lezama, E. (1999)** N,P, and K levels, anatomy of ovules, presence of pollen tubes and callosa in abortive ovaries of papaya (*Carica papaya* L.). Revista Chapingo. Sci Hort 5 (2): 125-130
- Bekendam, J., Grob R. (1979)** Handbuch der Keimlingsbeurteilung. ISTA, Zürich, Schweiz
- Bennett, J., Krishnan, A., Wiebold, W., Krishnan, H. (2003)** Positional effect on protein and oil content and composition of soybeans. J Agric Food Chem 51 (23): 6882-6886
- Bergervoet, J., Verhoeven, H., Gilissen, L., Bino, R. (1996)** High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. Plant Sci 116: 141-145
- Bergounioux, C., Brown, S., Petit, P. (1992)** Flow cytometry and plant protoplast cell biology. Physiologia Plantarum 85: 374-386
- Bewley J.D., Black M. (1994)** Seeds-Physiology of Development and Germination., Second Edition, Plenum Press, New York, London, S.52ff
- Bingham, E., Hawkins-Pfeiffer, J. (1984)** Female sterility in alfalfa due to a recessive trait retarding integument development. J Hered 75: 213-233
- Boavida L.C., Varela M.C., Feijo J.A. (1999)** Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). I. The programic phase. Sex Plant Reprod 11: 347-353
- Borisjuk, L., Walenta, S., Weber, H., Mueller-Klieser, W., Wobus, U. (1999)** High resolution histographical mapping of glucose concentration in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and starch accumulation: glucose as a possible developmental trigger. Plant J 15: 583-591
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Radchuk, R., Weschke, W., Wobus, U., Weber, H. (2004)** Seed development and differentiation: A role for metabolic regulation. Plant Biol 6: 375-386
- Bouman, F. (1984)** The ovule. In: Johr, M. Embryology of angiosperms. Springer Verlag, Berlin
- Braccini, I., Herve du Penhoat, C., Michon, V., Goldberg, R., Clochard, M., Jarvis, M., Huang, Z.H., Gage D. (1995)** Structural analysis of cyclamen seed xyloglucan oligosaccharides using cellulase digestion and spectroscopic methods. Carbohydrate Research 276: 167-181
- Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248
- Brar, G. (1977)** Variability in the fatty acid composition of sesame seed (*Sesamum indicum* L.) due to the capsule position on the plant and the seed position in the capsule. Crop Improvement 4 (1): 1-10
- Braune, W., Lehmann, A., Taubert, H. (1976)** Praktikum zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Pflanzen, Zur Einführung in den Bau, das Fortpflanzungsgeschehen und die Ontogenie der niederen Pflanzen und die Embryologie der Spermatophyta. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Braune, W., Lehmann, A., Taubert, H. (1987)** Pflanzenanatomisches Praktikum I, Zur Einführung in die Anatomie der Vegetationsorgane der Samenpflanzen., 5.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena

- Bucheli, P., Rousseau, G., Alvarez, M., Laloi, M., McCarthy, J. (2001)** Developemtal variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds. J Agric Food Chem 49(10): 5046-5051
- Casper, J. (1956)** Beiträge zur Embryologie der Gattung *Cyclamen* L., Diplomarbeit, Jena
- Cerovic, R., Vujicic, R., Micic, N. (1999)** Localization of polysaccharides in the ovary of sour cherry, Gartenbauwissenschaft 64 (1): 40-46
- Chandra, S., Bhatnagar, S. (1974)** Influence of ovule position on pollen-tube entry and seed set. Naturwissenschaften 61 (12): 688
- Chao, Y. (1971)** A periodic acid Schiff's substance related to the directional growth of pollen tubes into embryo sac in *Paspalum* ovules. Am J Bot 58: 649-654
- Chaubal, R., Reger, B.J. (1992)** The danamics of calcium distribution in the synergid cells of wheat after pollination. Sex Plant Reprod 5: 206-213
- Cheng, Z., Hsiao, K.C., Bornman, C. (1994)** Ploidy and division efficiency of petiolar protoplasts of *Brassica napus*. Hereditas 120: 41-46
- Chichiricco, G., Ragnelli, M., Aimola, P. (2002)** Ovary-ovule transmitting tract in *Crocus* (Iridaceae), structure and calcium distribution. Plant Sys Evo 235 (1-4): 155-167
- Chudzik, B., Sniezko, R. (1999)** Histochemical features signaling receptivity of ovules of *Oenothera hookeri* de Vries and *Oe.mut. brevistylis*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 41: 119-126
- Chudzik, B., Sniezko, R. (2003)** Calcium ion presence as a trait of receptivity in tenuinucellar ovules of *Galanthus nivalis* L. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 45 (1): 133-141
- Cochrane, P. (1999)** Seed carbohydrates. Ch.3 In: Black, M., Bewley, D. (eds) Seed Technology and its Biological Basis. Scheffield Academic Press, U.K.
- Cohan, Y., Eyal, H., Hanania, J. (1990)** Ultrastructure, autofluorescence, callose deposition and lignification in susceptible and resistant muskmelon leaves infected with the powelery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea*. Physiol Molec Plant Pathol 36: 191-204
- Colombo, L., Angenent, G. (1999)** MADS Box genes controlling ovule and seed development in *Petunia*. In: In: Crest, M., Cai, G., Moscatelli, A. (eds) Fertilization in Higher Plants. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Corbet, S. (1998)** Fruit and seed production in relation to pollination and resources in bluebell, *Hyacinthoides non scripta*. Oecologica 114 (3): 349-360
- Corbineau, F., Neveux, N., Come, D. (1989)** Seed germination and seedling development in *Cyclamen persicum*. Ann Bot 63 (1): 87-96
- Corbineau, F., Neveux, N., Come, D. (1989)** Characteristics of *Cyclamen persicum* Mill. Seed germination. Acta Hort (No.261): 337-346
- Corke, F., Hedley, C., Wang, T. (1990)** An analysis of seed development in *Pisum sativum* L. XI. Cellular development and the deposition of storage protein in immature embryos grown in vivo and in vitro. Protoplasma 155: 127-135

- Coste, F., Ney, B., Crozat, Y. (2001)** Seed development and seed physiological quality of field grown beans (*Phaseolus vulgaris* L.) . Seed Sci Technol 29 (1): 121-136
- Dangou, J., Hoher, V., Ferriere, N., Fulcheri, C., Morard, P., Alemanno, L. (2002)** Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. Seed Sci Res 12 (2): 91-100
- Detzel B.M.P. (1998)** Differenzierung der Blütenknospen, Pollenschlauchwachstum, Lebensfähigkeit der Samenanlagen, Embryo- und Endospermentwicklung sowie Fruchtansatz und Ertrag bei Zwetschen (*Prunus domestica* L.) in Abhängigkeit von der Stickstoffversorgung. Verlag Ulrich E.Grauer, Stuttgart
- Dhillon, S., Miksche, J. (1982)** DNA content and heterochromatin variations in various tissues of peanut (*Arachis hypogaeae*). Am J Bot 69 (2): 219-226
- Diaz-Pontones, D. (2000)** Morphological study on the pollinization and fertilization process of the morning glory: *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. Phyton Int. J. Exp. Bot. 69: 1-9
- Diggle P. (1995)** Architectural effects and the interpretation of patterns of fruit and seed development. Annu Rev Ecol Syst 26: 531-552
- Dittmann K. (1998)** Die Entwicklung der Samenanlagen und insbesondere des Endosperms, in Beziehung zum vorzeitigen Abfallen von Früchten bei der Gattung *Prunus*. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart
- Dornbos, D.Jr. (1994)** Production Environment and Seed Quality. In: Basra, A. Basic Mechanisms and Agricultural Implications. Food Products Press (Haworth Press) New York, London, Norwood
- Dumas, C., Knox, R. (1983)** Callose and determination of pistil viability and incompatibility. Theor Appl Genet 67: 1-10
- Dys, B. (1984)** Cyto-embryological studies in self-incompatible and self-fertile cultivars of sour-cherries (*Cerasus vulgaris* Mill.). II Development of embryo sacs and ovules at some stages of floescence. Genetica Polonica 25 (2): 171-180
- Eaton, G., Jamont, A. (1964)** Embryo sac development in the Apricot, *Prunus armeniaca* L. cv Constant. J Am Soc Hort Sci 86: 95-101
- Egli, D., Bruening, W. (2001)** Source-Sink relationships, seed sucrose levels and seed growth rates in soybean. Ann Bot 88(2): 235-242
- Engelen-Eigers, G., Jones, R., Phillips, R. (2000)** DNA endoreduplikation in maize endosperm cells: the effect of exposure to short-term high temperature. Plant Cell Env 23: 657-663
- Erbar, C. (2003)** Pollen tube transmitting tissue: Place of competition of male gametophytes. J Plant Sci 164 (5): 265-277
- Eschrich, W. (1995)** Funktionelle Pflanzenanatomie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Espadaler, X., Gomez, C. (2001)** Female performance in *Euphorbia characias*: effect of flower position on seed quantity and quality. Seed Sci Res 11 (2): 163-172
- Esser K. (1963)** Bildung und Abbau von Callose in den Samenanlagen der *Petunia hybrida*. Zeitschrift für Botanik 51, 32-52

- Ewald, A., Schwenkel, H.G. (1999)** Einfluß von Blütenalter und Genotyp auf den Samenansatz von *Cyclamen persicum* „Sylvia“. Gartenbauwissenschaft 64 (2): 49-53
- Faure J.E., Digonnet, C., Dumas, C. (1994)** An in vitro system for adhesion and fusion of maize gametes. Science 263: 1598-1600
- Fenster, C. (1991)** Effect of male pollen donor and female seed parent on allocation of resources to developing seeds and fruit in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). Am J Bot 78 (1): 13-23
- Fernando DD., Cass DD. (1997)** Developmental assessment of sexual reproduction in *Butomus umbellatus* (Butomaceae): Female reproductive component. Ann Bot 80 (4): 457-467
- Fiordi, A., Palandri, M., Turicchia, S., Tani, G., DiFalco, P. (2001)** Characterization of seed reserves in Tillandsia (Bromeliaceae) and ultrastructural aspects of their use at germination. Caryologia 54(1): 1-16
- Franklin-Tong, V.E. (1999)** Signalling and the modulation of pollen tube growth. Plant Cell 11: 727-738
- Franssenverheijen, M., Willemse, M. (1993)** Micropylar exudate in Gasteria (Aloaceae) and its possible function in Pollen tube growth. Am J Bot 80 (3): 253-262
- Fukuhara, T. (2000)** Variation of pollen and ovule parameters among different ploidy levels of Corydalis (Fumariaceae). Plant Sys Evo 224 (1/2): 1-12
- Gal, le F., Hallet, J., Rey, L. (1984)** DNA and protein content relationship in the cells of mature cotyledons of *Pisum sativum*. Protoplasma 120: 113-122
- Galloway, L.F. (2001)** The effect of maternal and paternal environments on seed characters in the herbaceous plant *Campanula americana* (Campanulaceae). Am J Bot 88, 832-840
- Gayle, M., Franceschi, V. (2000)** Localization of a calcium channel-like protein in the sieve element plasma membrane. Austr J Plant Physiol 27 (8-9): 779-786
- Gomez J.M., Zamora R. (2003)** Factors affecting intrafruit pattern of ovule abortion and seed production in *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). Plant Sys Evo 239 (3-4): 215-229
- Gonzalezrabanal, F., Casal, M. Trabaud, L. (1994)** Effects of high temperatures, ash and seed position in the inflorescence on the germination of 3 Spanish Grasses. J Veg Sci 5 (3): 289-294
- Gorecki, R., Piotrowiczieslak, A., Obendorf, R. (1997)** Soluble sugars and flatulence-producing oligosaccharides in maturing yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds. Seed Sci Res 7 (2): 185-193
- Green, P. (1999)** Seed germination in *Chrysophyllum sp nov.* a large seeded rainforest species in north Queensland: effects of seed size, litter depth and seed position. Austr J Ecol 24 (6): 608-613
- Gurusamy, C., Bal, A. (2000)** Effect of seed abortion on the pattern of seed formation in *Lathyrus maritimus* and *L. sativus* (Fabaceae). Phytol. Annales Rei Botanicae 40 (2): 223-238
- Gutierrez, D., Menendez, R., Obeso, J. (1996)** Effect of ovule position on seed maturation and seed weight in *Ulex europaeus* and *Ulex galli* (Fabaceae). Can J Bot 74: 848-853
- Guttermann, Y. (1994)** Long-term seed position influences on seed germinability of the dessert annual, *Mesembryanthemum nodiflorum* L. Isr J Plant Sci 42 (3): 197-205

- Guttermann, Y. (2000)** Maternal effects on seed during development. Ch.3, pp. 59ff In: Fenner, M. Seeds, The Ecology of Regeneration in Plant Communities. CABI Publishing, New York
- Hagemann, W. (1959)** Vergleichende morphologische, anatomische und entwicklungsgeschichtliche Studien an *Cyclamen persicum* Mill. sowie einigen weiteren Cyclamenarten. Botanische Studien, Heft 9, Gustav Fischer Verlag, Jena
- Haig, D., Westoby, M. (1989)** Selective forces in the emergence of the seed habit. Biol. J. Linn Soc 38: 215-238
- Hartwig, E., Kuo, T., Kenty, M. (1997)** Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybean. Crop Science 37(3): 770-773
- Helenerum, K., Schaal, B.A. (1996)** Genetic and maternal effects on offspring fitness in *Lupinus texensis* (Fabacea). Am J Bot 83, 1596-1608
- Hensel, A., Brummell, D., Hanna, R., Maclachlan, G. (1991)** Auxin dependent breakdown of Xyloglucan in cotyledons of germinating Nasturtium seeds. Planta 183(3): 321-326
- Herr J.M. Jr. (1971)** A new clearing- squash technique for the study of ovule Development in angiosperms. Am J Bot 58: 785-790
- Herranz, J., Ferrandis, P., Copete, M. (2003)** Influence of temperature, maternal source, and seed position in fruit on seed germination and ability to form soil seed banks in threatened species of Coincya (Cruciferae). Israel Journal of Plant Sci 51 (2): 133-141
- Herrero M., Arbeloa A. (1989)** Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). Am J Bot 76 (10): 1441-1447
- Herrero M., Hormaza J.I. (1996)** Pistil strategies controlling pollen tube growth. Sex.Plant Reproduction (1996) 9:343-347
- Herrero, M. (2000)** Changes in the ovary related to pollen tube guidance. Ann Bot 85: 79-85
- Herrero, M. (2001)** Ovary signals for directional pollen tube growth. Sex Plant Reprod 14: 3-7
- Hilhorst; H., Karssen, C. (2000)** Effect of Chemical Environment on Seed Germination. Ch.12 pp.293ff. In: Fenner, M. Seeds, The Ecology of Regeneration in Plant Communities. CABI Publishing, New York
- Holtzhauer, M. (1997)** Proteinbestimmung nach BRADFORD (Kap.1.1.3.) aus Biochemische Labormethoden, 3.Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Hossaert, M., Valero, M. (1988)** Effect of ovule position in the pod on patterns of seed formation in two species of Lathyrus (Leguminosae: Papilionoideae). Am J Bot 75 (11): 1714-1731
- Hsu, S., Hadley, H., Hymowitz, T. (1973)** Changes in carbohydrate contents of germination soybean seeds. Crop Science 13(4): 407-410
- Huang B.Q., Russel S.D. (1992)** Female Germ Unit: Organization, Isolation, and Function. International Rev Cytol Vol. 140: 233-293
- Hülkamp, M., Schneitz, K., Pruitt, R. (1995)** Genetic evidence for a long range activity that directs pollen tube guidance in Arabidopsis. Plant Cell 7: 57-64

- Ilarsen, H., Palmer, R., Imsande, J., Horner, H. (2001)** Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. *Ann Bot* 88 (2):243-257
- Ilarsen, H., Palmer, R., Imsande, J., Horner, H. (1997)** Quantitative determination on Calcium oxalate and oxalate in developing seeds of Soybean (Leguminosae). *Am J Bot* 84 (8): 1042-1046
- Jacobsen, K., Berry, A. (2002)** Callose in Frankia infected tissue of *Datisca glomerata* is an artifact of specimen preparation. *Plant Biol* 4 (1): 46-52
- Jeyaretnan, B., Levi, A., Phatak, S., Wetzstein, H. (1999)** Changes in growth, water content and protein reflect embryo development in pecan (*Carya illinoensis*) *J Horti Sci Biotechnol* 74: 315-320
- Johri, B., Shgal, C. (1966)** Growth response of ovaries of Anethum, Foeniculum and Trachyspermum. *Phytomorphology* 1966: 364-378
- Johri B.M., Ambegaoker K.B., Srivastava P.S. (1992)** Comparative Embryology of Angiosperms. Vol.2, pp.629-635, Springer Verlag, Berlin
- Jurzitza, G. (1987)** Anatomie der Samenpflanzen, Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Kalisz, S. (1989)** Fitness consequences of mating system, seed weight, and emergence date in a winter annual, *Collinsia verna*. *Evolution* 43, 1263-1272
- Kapil, R., Tiwari, S. (1978)** Plant embryological investigations and fluorescence microscopy: an assessment of integration. *Int Rev Cytol* 53: 291-331
- Kapil, R., Bhatnagar, A. (1981)** Ultrastructure and biology of female gametophyte in flowering plants. *Int Rev Cytol* 79: 291-341
- Karimov, K., Dontsova, S. (1999)** Soluble proteins in cotton seeds as related to their viability. *Rus J Plant Physiol* 46(3): 416-422
- Karkkainen K., Savolainen, O., Koski, V. (1999)** Why do plants abort so many developing seeds: bad offspring or bad maternal genotypes? *Evolutionary Ecology* 13 (3): 305-317
- Katepa Mupondwa, FM., Barnes, DK., Smith, SR. (1996)** Influence of parent and temperature during pollination on alfalfa seed weight and number of seeds per pod. *Can J Plant Sci* 76 (2): 259-262
- Kiernan J.A. (1990)** Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice pp. 222-223, 2. Aufl. Pergamon Press Oxford
- Knox, B., Williams, E., Dumas, C. (1986)** Pollen, Pistil and Reproductive Function in Crop Plants. *Plant Bree Rev* 4: 9-79
- Kolyasnikova N.L. (1985)** Determining the fertility of alfalfa by means of fluorescence microscopy. *Bot Issledovaniya na Urale* 25
- Köhler, W., Schachtel, G., Voleske, P. (1996)** Biostatistik, Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler, 2.Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Kranz, E., Lörz, H. (1994)** In vitro fertilization of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion mediated by high calcium and high pH. *Zygote* 2: 125-128

- Lau, T., Stephenson, A. (1993)** Effects of soil nitrogen on pollen production, pollen grain size, and pollen performance in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Am J Bot* 80: 763-768
- Lazcano, O., Bilbao, J., Beissner, R., Vandiver, M., Li, C.Y. (1992)** Permanent stained preparations of synovial fluid for detection of calcium components using Alizarin Red S. *Biotechnic & Histochemistry* 67 (1):14-20
- Lee, S.W., Lee, J.M. (1986)** Effect of cultivar, sowing media, seed size and gibberelin treatment on seed germination and seedling growth in *Cyclamen persicum* Mill. *J Kor Soc Horti Sci* 27 (3): 283-288
- Lee, H.S., Chung, Y.Y., Chandreyee, D., Karunanandaa, B., van Went, J., Mariani, C., Kao, T.H. (1997)** Embryo sac development is affected in *Petunia inflata* plants transformed with an antisense gene encoding the extracellular domain of receptor kinase PRK1. *Sex Plant Reprod* 10 (6): 341-350
- Libbert E. (1987)**, Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, 4. Aufl. 1987, p.154, Gustav Fischer Verlag, Jena
- Lühs, W., Baetzel, R., Friedt, W. (2000)** Zur Kombinierbarkeit von hoher Saatgutqualität und wertvollen Korninhaltsstoffen bei Raps (*Brassica napus*): Möglichkeiten und Grenzen. Bericht der 51. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter 2000
- Malcom, P.J., Holford, P., McGlasson, W.B., Newman, S. (2003)** Temperature and seed weight affect the germination of peach rootstock seeds and the growth of rootstock seedlings. *Sci Hort* 98 (3): 247-256
- Maldonado, S., Etchart, C., Lainez, M., De Lederkremer, R. (1998)** Ultrastructural and chemical studies on seeds of *Bulnesia schickendantzii*. *Acta Bot Ned* 47(3): 285-297
- Malho, R., Trewavas, A. (1996)** Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* 8 (11): 1935-1949
- Malho, R. (1998)** Pollen tube guidance – the long and winding road. *Sex Plant Reprod* 11: 242-244
- Malho, R. (1999)** The role of Calcium and associated Proteins in tipp growth and orientation.(Ch.18) In: Crest, M., Cai, G., Moscatelli, A. (eds) *Fertilization in Higher Plants (Molecular and Histological Aspects)*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Manasse, R., Stanton, M. (1991)** The influence of the mating system on seed size variation in *Crinum erubescens* (Amaryllidacea). *Evolution* 45 (4): 883-890
- Marshall, A., James, I., Potter, J. (1996)** Ovule abortion in white clover. *Ann App Bio* 128 (1): 95-103
- Martinez-Palle, E., Herrero, M. (1995)** The ponticulus: a structure bridging pollen tube access to the ovule in *Pistacia vera*. *Sex Plant Reprod* 8: 217-222
- Martinez-Palle E., Herrero M. (1998)** Pollen tube pathway in chalazogamous *Pistacia vera* L.. *Int J Plant Sci* 159(4): 566-574
- Mascarenhas, J., Machlis, L. (1962)** The pollen tube chemotropic factor from *Antirrhinum majus*: bioassay, extraction, and partial purification. *Am J Bot* 49: 482-489

- Mascarenhas, J., Machlis, L. (1964)** Chemotropic response of the pollen of *Antirrhinum majus* to calcium. *Plant Physiol* 39: 70-77
- Mayer, A., Poljakoff-Mayber, A. (1988)** The Ecology of Germination, The Seed in its natural environment. Ch.7 pp.201 ff In: The Germination of Seeds 4.Edition, Pergamon Press, Jerusalem
- Mazer, S. (1987)** Parental effects on seed development and seed yield in *Raphanus raphanistrum*: Implications for natural and sexual selection. *Evolution* 41 (2): 355-371
- Melser, C., Klinkhamer, P.G.L. (2001)** Selective seed abortion increases offspring survival in *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae). *Am J Bot* 88 (6): 1033-1040
- Millerd, A., Spencer, D. (1974)** Changes in RNA-synthesizing activity and template activity in nuclei from cotyledons of developing pea seeds. *Austr J Plant Physiol* 1: 331-341
- Miyajima, d., Karito, I., Fujisawa, R. (2003)** Ovule and seed abortion in Japanese morning glory (*Ipomoea nil* (L.) Roth.). *J Jap Soc Hort Sci* 72 (5): 402-408
- Mogensen, H. (1975)** Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). *Am J Bot* 62: 160-165
- Mol, R., Matthys-Rochon, E., Dumas, C. (1994)** The kinetics of cytological events during double fertilization in *Zea mays* L. *The Plant J* 5 (2): 197-206
- Montalvo, A.M. (1994)** Inbreeding depression and maternal effects in *Aquilegia caerulea*, a partially selfing plant. *Evolution* 53, 100-110
- Moreno, D., Villora, G., Romero, L. (2003)** Variations in fruit micronutrient contents associated with fertilization of cucumber with macronutrients. *Sci Hort* 97: 121-127
- Mori, F., Tanji, K., Wakabayashi, K. (2000)** Widespread calcium deposits, as detected using the alizarin red S technique in the nervous system of rats treated with dimethyl mercury. *Neuropathology* 20 (3): 210-215
- Nakamura, R. (1988)** seed abortion and seed weight variation within fruits of *Phaseolus vulgaris*: pollen donor and resource limitation effects. *Am J Bot* 75: 1003-1010
- Naylor, R.E.L. (1993)** The effect of parent plant nutrition an seed size, viability and vigor and on germination of Wheat and Triticale at different temperatures. *Ann App Bio* 123 (2): 379-390
- Nerson, H. (2001)** Effects of seed maturity, extraction practices and storage duration on germinability in watermelon. *Sci Hort* 93: 245-256
- Neubohn, B., Gubatz, S., Wobus, U., Weber, H. (2000)** Sugar levels altered by ecotropic expression of a yeast-derived invertase affect cellular differentiation of developing cotyledons of *Vicia narbonensis* L. *Planta* 211(3): 325-334
- Nkang, A. (2002)** Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *J Plant Physiol* 159(5): 473-483
- Obendorf, R., Horbowicz, M., Taylor, D., Slawinska, J. (1992)** Buckwheat seed development and regulation of seed set. *Proceedings of the Fourth International Workshop on Seeds 1992*, Angers, France. 39-46

- Oryol, L.I., Kostantinova, L.N., Ogorodnikova, V.F., Dzyubenko, N.I. (1986)** The fertility of lucerne ovules and methods for its evaluation. Sbornik Nauchnykh Trudov po Prikladnoi Botanike, Genetika i Seleksii 99: 10-17
- Oryol, L.I., Kazachkovskaya, E.B. (1991)** Embryological heterogeneity as the cause of reduction in seed productivity in *Medicago sativa* (Fabaceae). Bot Zhurl 76:161-172
- Pallais, N. (1995)** High-temperature and low moisture reduce the storage requirement of freshly harvested true potato seeds. J Am Soc Hort Sci 120 (4): 699-702
- Palser, B., Rouse, J., Williams, E. (1992)** Techniques for clearing ovules for study of megagametophyte and early postfertilization development in *Rhododendron*. Biotechnic & Histochemistry 67(4): 207-218
- Pascual, B., San Bautista, A., Ferreros, N., Lopez-Galarza, S., Maroto, J. (2002)** Analysis of germination of caper seeds as influenced by the position of fruit on the mother plant, fruit maturation stage and fruit weight. J Hort Sci Biotechnol 78 (1): 73-78
- Peak, N., Imsande, J., Shoemaker, R., Shibles, R. (1997)** Nutritional control of soybean seed storage protein. Crop Science 37(2): 498-503
- Perry, D. (1987)** Handbuch der Methoden zur Prüfung der Triebkraft. ISTA, Zürich, Schweiz
- Phartyal, S., Thapliyal, R., Nayal, J., Joshi, G. (2001)** Seed development in Himalayan elm (*Ulmus wallichiana*). Seed Sci Technol 30 (2): 575-584
- Pico, F.X., Ouburg, N.J., Groenendaal van, J.M. (2003)** Fitness Traits and dispersal Ability in the herb *Tragopogon pratensis* (Asteraceae): Decoupling the role of inbreeding depression and maternal effects. Plant Biol 5 (2003): 522-530
- Pimienta, E., Polito, V. (1982)** Ovule abortion in "Nonpareil" almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D.A. Webb). Am J Bot 69: 913-920
- Plitmann U. (1993)** Pollen tube attrition as related to breeding systems in Brassicaceae. Plant Sys Evo 188: 65-72
- Porceddu, A., Moretti, C., Sorbolini, S., Guiderone, S., Lanfaloni, L., Lorenzetti, F., Pezzotti, M. (1999)** Molecular Approach to Female Meiosis in *Petunia hybrida*. In: Crest, M., Cai, G., Moscatelli, A. (eds) Fertilization in Higher Plants. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Pretova, A., Obert, B., Hajdich, M., Gregova, E. (2001)** Total protein and isozyme characterization in the flax zygotic embryo during development. Sex Plant Reprod 13: 329-334
- Raghavan, V. (2000)** Pollen-Pistil Interactions and Fertilization. In Developmental Biology of Flowering Plants. pp.228-233, Springer V., New York
- Raghavender, Rao, P., Gopal Singh, B. (1996)** Effect of variation in ratio of endosperm on seedling vigour in maize (*Zea mays*). Ind J Agric Sci 66 (11): 658-660
- Rapoport, H., Rallo, L. (1990)** Ovule development in normal and parthenocarpic olive fruits. Acta Hort 286: 233-226
- Rediske, J. (1969)** effects of cone-picking date on Douglas fir seed quality. Forest Science 15: 404-410

- Reger, B.J., Chaubal, R., Pressey, R. (1992)** Chemotropic responses by pearl millet pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 5: 47-56
- Ribeiro, M., Ida, E., de Oliveira, M. (1997)** Germination of soybean Br-13 and Parana: Effects on protein, lipid and carbohydrate. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 40(1): 9-17
- Richter, G. (1988)**, Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 5. Aufl. , p.279 ff, Thieme Verlag, Stuttgart
- Rigney, L. (1995)** Postfertilization causes of differential success of pollen donors in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae): non-random ovule abortion. *Am J Bot* 82: 578-584
- Rocha, O., Stephenson, A. (1991)** Effects of nonrandom seed abortion on progeny performance in *Phaseolus coccineus* L. *Evolution* 45 (5): 1198-1208
- Rodkiewicz, B. (1970)** Callose in the cell walls during megasporogenesis in angiosperms. *Planta* 93: 39-47
- Rodrigo, J., Herrero, M. (1997)** Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sex Plant Reprod* 11 (2): 86-93
- Roh, M.S., Bentz, J.A., Wang, P., Li, E., Koshioka, M. (2004)** Maturity and temperature stratification affect the germination of *Styrax japonicus* seeds. *J Hort Sci Biotechnol* 79 (4): 645-651
- Rosellini, D., Lorenzetti, F., Bingham, E.T. (1998)** Quantitative ovule sterility in *Medicago sativa*. *Theor Appl Genet* 97: 1289 – 1295
- Rosellini, D., Ferranti, F., Barone, P. Veronesi, F. (2003)** Expression of female sterility in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Sex Plant Reprod* 16 (6): 271-279
- Rothe, K., Porzel, A., Neumann, S., Grimm, E. (1999)** Characteristics of the phloem path: analysis and distribution of carbohydrates in the petiole of *Cyclamen*. *J Exp Bot* 50 (341): 1807-1816
- Roux le, L.G., Robbertse, P.J., Merwe van der, C.F. (1996)** The transmitting tract in *Gloriosa superba*: Structure, pistil exudates and pollen tube growth. *S Afr J Bot* 62 (4): 204-208
- Russel, S.D. (1992)** Double fertilization. *Int Rev Cytol* 140: 357-388
- Russel, S.D. (1996)** Attraction and transport of male gametes for fertilization. *Sex Plant Reprod* 9: 337-342
- Sacande, M., Groot, S., Hoekstra, F., Decastro, R., Bino, R. (1997)** Cell cycle events in developing neem (*Azadirachta indica*) seeds-Are they related to intermediate storage behaviour. *Seed Sci Res* 7 (2): 161-168
- Sage, T.L., Strumas, F., Cole, W.W., Barrett, Sch. (1999)** Differential ovule development following self- and cross-pollination: The basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Armryllidaceae). *Am J Bot* 86(6): 855-870
- Sanders, D., Allen, G., Muir, S., Roberts, S. (1998)** Integration of Ion Channel Activity in Calcium Signalling Pathways. In: Shiavo, F., Last, R., Morelli, G., Raikhel, N. *Cellular Integration of Signalling Pathways in Plant Development*. Springer Verlag, Berlin
- Sasaki, R.M., Felipe, G.M. (1999)** Single-seeded fruits and seedling establishment in *Dalbergia miscolobium* Benth. (Papilionaceae). *Biotropica* 31 (4): 591-597

- Schlagorsky, M. (1949)** Das Bauprinzip des *Cyclamen Primulaceae* gynözeums bei der Gattung *Cyclamen*. Österreich. Bot. Zeitschrift 96, 361-369
- Schwemmler, J. (1968)** Selective fertilization in *Oenothera*. Adv Genet 14: 225-324
- Schwenkel, H.-G., Winkelmann, T. (1998)** Plant regeneration via somatic embryogenesis from ovules of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Tiss Cult Biotechnol, 4, 28-34
- Scribailo, R.W., Barrett, Sch. (1991)** Pollen-Pistil Interactions in Tristylous *Pontederia sagittata* (Pontederiaceae). 2. Patterns of Pollen-Tube growth. Am J Bot 78 (12): 1662-1682
- Sedgley, M. (1981)** Early development of the *Macadamia* ovary. Austr J Bot 29:185-193
- Shimizu, K., Okada, K. (2000)** Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in *Arabidopsis* pollen tube guidance. Development 127: 4511-4518
- Shuraki, Y.D., Sedgley, M. (1997)** Pollen tube pathway and stimulation of embryo sac development in *Pistacia vera* (Anacardiaceae). Ann Bot 79 (4): 361-369
- Sliwinska, E. (2000)** Analysis of the Cell Cycle in Sugarbeet Seed during Development, Maturation and Germination. In: Black, M., Bradford, K., Vazquez-Ramos, J. (eds.) Seed Biology, Advances and Applications, Proceedings of the Sixth International Workshop on Seeds, Merida, Mexico, 1999, CABI Publishing
- Smith, A., Bruton, J. (1979)** Farbatlas histologischer Färbemethoden, p.114, F.K.Schattauer Verlag, New York
- Smittle, D.A. (1982)** Radish (*Raphanus sativa*) growth and yield responses to seed grading by size and aspiration. Seed Sci Technol 10 (2): 199-205
- Stephenson, A. (1981)** Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate function. Annu Rev Ecol Syst 12: 253-279
- Stern, R.A., Eisenstein, D., Voet, H., Gazit, S. (1997)** Female 'Mauritius' Flowers are not fully mature at anthesis. J Hort Sci 72(1):19-25
- Stitt, M. (1999)** Nitrate regulation of metabolism and growth. Current Opinion Plant Biol 2: 178-186
- Stösser, R., Anvari, S. (1982)** On the senescence of ovules in cherries. Sci Hortic 16: 29-38
- Strasburger (1998)** Lehrbuch der Botanik 34. Aufl., p.91ff, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin
- Susko, D.J., Lovett-Doust, L. (1999)** Effects of resource availability, and fruit and ovule position on components of fecundity in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). New Phytologist 144 (2): 295-306
- Susko, D., Lovett-Doust, L. (2000)** Patterns of seed mass variation and their effects on seedling traits in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). Am J Bot 87 (1): 56-66
- Takamura, T., Miyajima, I. (1996)** Embryo development in crosses between diploid and tetraploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). J Jap Soc Hort Sci 65 (1): 113-120
- Tashiro, T., Fukuda, Y., Osawa, T. (1991)** Oil content of seeds and minor components in the oil of sesame, *Sesamum indicum* L. as affected by capsule position. Jap J Crop Sci 60 (1): 116-121

- TeKrony, D., Egli, D. (1997)** Accumulation of seed vigour development and maturation. In: Ellis, R., Black, M., Murdoch, A., Hong, T. (eds), Basic and Applied Aspects of Seed Biology, pp.369-384. Kluwer Academic publishers, Dordrecht. G.Britain
- Thomas, R. (1996)** Limitations to seed set in white clover (*Trifolium repens* L.). I. Preliminary observations. J Appl Seed Prod 14:59-66
- Tian, H.Q., Russel, S.D. (1996)** Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. Planta 202 (1): 93-105
- Tian, H.Q., Zhu, H., Russel, S.D. (2000)** Calcium changes in ovules and embryo sacs of *Plumbago zeylanica* L. Sex Plant Reprod 13: 11-20
- Tilton, V., Wilcok, L., Palmer, R., Albertsen, M. (1984)** Stigma, style and Obturator of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. (Leguminosae) and their function in the reproductive process. Am J Bot 71 (5): 676-686
- Tirlapur, U. Willemse, M. (1992)** Changes in calcium and calmodulin levels during microsporogenesis, pollen development and germination in *Gasteria verrucosa* (Mill). Sex Plant Reprod 5 (3): 214-223
- Tirlapur, U., van Went, J., Cresti, M. (1992)** Visualization of Membrane Calcium and Calmodulin in Embryo Sacs in situ and Isolated from *Petunia hybrida* L. and *Nicotiana tabacum* L. Ann Bot 71: 161-167
- Tiwari S.C. (1982)** Callose in the Walls of Mature Embryo Sac of *Torenia fournieri*. Protoplasma 110, 1-4
- Tomer, E., Gottreich, M. (1976)** Defective Ovules in *Avocado* Cultivars. J Am Soc Hort Sci 101 (5): 620-623
- Toth, R. (1982)** An introduction to morphometric cytology and its application to botanical research. Am J Bot 69 (10): 1694-1706
- Tremayne, M., Richards, A. (2000)** Seed weight and seed number affect subsequent fitness in outcrossing and selfing *Primula* specie. New Phytol. 148: 127-142
- Tucker, M. Peach, N., Willemse, M. Koltunow, A. (2001)** Dynamics of Callose deposition and beta-1,3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomictic *Hieracium*. Planta 212 (4): 487-498
- Verma, D., Hong, Z. (2001)** Plant callose synthase complexes (Review). Plant Mol Biol 47 (6): 693-701
- Wagner, J., Reichegger, B. (1997)** Phenology and seed development of the alpine sedges *Carex curvula* and *Carex firma* in response to contrasting topoclimates. Arctic & Alpine Research 29 (3): 291-299
- Wallis, J., Shockey, J., Browse, J. (1999)** Seed oil and their metabolic engineering. Ch.4 In: Black, M., Bewley, D. (eds) Seed Technology and its Biological Basis. Scheffield Academic Press, U.K.
- Wang, X.F., Tao, Y.B., Lu, Y.T. (2002)** Pollen tubes enter neighbouring ovules by way of receptacle tissue, resulting in increased fruit set in *Sagittaria potamogetifolia* Merr. Ann Bot 89 (6): 791-796

- Webb, M., Gunning, B. (1994)** Cell biology of embryo sac development in *Arabidopsis*. In: Williams, E., Clarke, A., Knox, R. (eds) Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. *Mol Biol Plants* 2: 461-485
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U. (1997)** Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Sci* 2 (5): 169-174
- Weber, H., Heim, U., Golombek, S., Borisjuk, L., Wobus, U. (1998)** Assimilate uptake and the regulation of seed development. *Seed Sci Res* 8: 331-345
- Werther, S. (1998)** Untersuchungen zur Pollenvitalität bei *Cyclamen persicum* Mill. Diplomarbeit Fachhochschule Erfurt und IGZ Kühnhausen
- Weschke, W., Panitz, R., Sauer, N., Wang, Q., Neubohn, B., Weber, H., Wobus, U. (2000)** Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J* 21 (5): 455-467
- Willemse, M., Lammeren van, A. (2002)** Fertilization, from attraction to embryo. *Biologia (Bratislava)* 57 (1): 13-22
- Wittich, P., Willemse, M. (1999)** Sucrose utilization during ovule and seed development of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval as monitored by sucrose synthase and invertase localization. *Protoplasma* 208 (1-4): 136-148
- Wobus, U., Weber, H. (1999)** Sugars as signal molecules in plant development. *Biol Chem* 380: 937-944
- Xu, G., Kafkafi, U., Wolf, S., Sugimoto, Y. (2002)** Mother plant nutrition and growing condition affect amino and fatty acid compositions of hybrid sweet pepper seeds. *J Plant Nut* 25 (8): 1645-1665
- Yanful, M., Maun, M. (1996)** Spatial distribution and seed mass variation of *Strophostyles helvola* along Lake Erie. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 74 (8): 1313-1321
- Yang, H.Y. (1999)** The role of calcium in the fertilization process in flowering plants. *Acta Bot Sin* 41 (10): 1027-1035
- Yeung, E., Law, S. (1989)** Embryology of *Epidendrum ibaguense*. I. Ovule development. *Can J Bot* 67: 2219-2226
- Yu, F.L., Zhao, J., Liang, S.P., Yang, H.Y. (1999)** Ultracytochemical localization of calcium in the gynoecium and embryo sac of rice. *Acta Bot Sin* 41: 125-129
- Zhang, J.S., Yang, H.Y., Zhu, L., Tong, H. (1995)** Ultracytochemical localization of calcium in the stigma, style and micropyle of sunflower. *Acta Bot Sin* 37: 691-696
- Zhang, G., Cass, D.D. (1997)** Calcium signalling in sexual reproduction of flowering plants. *Recent Res Dev Plant Physiol* 1: 75-83
- Zhao, J., Yu, F.L., Liang, S.P., Zhou, C., Yang, H.Y. (2002)** Changes of Calcium distribution in egg cells, zygotes and two-celled proembryos of rice (*Oryza sativa* L.). *Sex Plant Reprod* 14: 331 – 337

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Hellwig für die Überlassung des Themas und die Freiheit bei dessen Bearbeitung sowie für die fachliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Aloma Ewald für die kompetente Betreuung dieser Arbeit sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts und darüber hinaus auch für die menschliche Unterstützung.

Ebenso gilt mein Dank:

- Frau Sabine Kalkofe für die technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente.
- Frau Bärbel Broszies für die Anleitung und Hilfestellung bei der Kohlenhydratanalyse.
- Frau Barbara Weinlich für die Unterrichtung in der Mikrotomschnitttechnik
- Herrn Joachim Hartung für seine Bereitschaft die RAPD-PCR Untersuchungen an den Cyclamen durchzuführen.
- Frau Rosemarie Stimper sowie den Mitarbeitern der Pathologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena, dass sie mir die Möglichkeit eingeräumt haben, hochwertige rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen meiner Objekte anzufertigen.

Weiterhin möchte ich ganz herzlich danken:

- Den Gärtnern im Institut, die meine Pflanzen liebevoll pflegten.
- Allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des IGZ, die durch ihre Kollegialität einen großen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit hatten.

Zuletzt gilt der Dank meiner Familie, die mir aufopferungsvoll alle nötigen Freiheiten einräumten und damit zum Gelingen dieser Arbeit viel beitrugen.

Thema: Vergleichende morphologisch-anatomische und physiologische Untersuchungen zur Samenanlagenqualität von *Cyclamen persicum* Mill.- unter besonderer Berücksichtigung der Saatgutqualität

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neben der grundlegenden Betrachtung der Anatomie und Morphologie der Samenanlagen ausgewählter Genotypen von *Cyclamen persicum* und der Gewinnung von Erkenntnissen zu physiologischen Prozessen in der Samenanlage vor, während und nach einer Befruchtung vor allem Samenentwicklungsprozesse und Sameninhaltsstoffe zu analysieren, um Ursachen für Unterschiede in der Saatgutqualität und dem Samenertrag zu finden. Daneben war die Fragestellung zu beantworten, inwieweit der Samenertrag und die Saatgutqualität bei *Cyclamen persicum* bereits auf der Stufe der Samenanlagen prädestiniert ist. Ebenso war die Anpassung bestimmter Methoden zur Feststellung der Samenanlagen- bzw. Samenqualität Ziel dieser Arbeit.

Es wurden im Wesentlichen die folgenden Ergebnisse erzielt:

1. Die Samenanlagen sind als hemianatroper Typ zu klassifizieren. Außerdem besitzen sie auf der Mikropyle einen Obturator.
2. Die Heterogenität der Embryosackgröße zu Anthesebeginn ist wahrscheinlich Ausdruck von Entwicklungsunterschieden der Samenanlagen an einer Plazenta oder als erstes Anzeichen von Degeneration zu werten.
3. Der Verlauf der Calloseeinlagerung in den Samenanlagen drei Tage vor bis zehn Tage nach Anthesebeginn steht offenbar mit dem Befruchtungsprozess in Verbindung.
4. Intrazelluläres Calcium fungiert als Chemoattraktant für das Pollenschlauchwachstum.
5. Drei bzw. fünf Tage vor Anthesebeginn sind alle Samenanlagen an einer Plazenta gleich in ihrem Entwicklungsstand.
6. Im Endosperm reifer Samen kommen als Reservestoff vor allem Lipide vor. Unter den untersuchten Kohlenhydraten hat die Saccharose den größten Anteil.
7. Die Proteinkonzentration im Samen ist ein genotypabhängiges Maß bei *Cyclamen persicum*.
8. Die Saccharosekonzentration und die Proteinkonzentration in Verbindung mit der Mitoseaktivität im Samen ist ein guter Marker zur Beurteilung der Reife des Samens.
9. Samenanlagen bzw. Samen weisen positionsabhängige Unterschiede hinsichtlich der Samenanlagen- bzw. Samenqualität auf.
10. Auch die Samenentwicklung und Samenreifung erfolgt positionsabhängig.
11. Es gibt eine Beziehung zwischen der Embryosackheterogenität, der Calloseeinlagerung und Abweichen mit dem Samenertrag.
12. Das Samengewicht korreliert mit der Keimfähigkeit sowie der Triebkraft.
13. Die Proteinkonzentration im Samen korreliert mit der Triebkraft und teilweise mit der Keimfähigkeit.

Erklärung der Autorin

Ich erkläre ehrenwörtlich,

- dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist.
- dass ich die Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe.
- dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde.
- dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.
- dass ich keine gleiche oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, 12. Mai 2005

A handwritten signature in black ink, reading 'Sandra Reinhardt' in a cursive script.

Sandra Reinhardt

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Sandra Reinhardt
Walter-Rein-Str.51
99195 Stotternheim

geboren am 30. Juli 1975 in Erfurt
ledig, eine Tochter (geb. 26.3.2004)

Schulausbildung:

9 / 1982 – 7 / 1990 Grundschule (POS 48) in Erfurt

9 / 1990 – 6 / 1994 Gymnasium – Baron Pierre de Coubertin
Sportgymnasium in Erfurt

6 / 1994 Abitur

Studium:

10 / 1994 Immatrikulation an der Friedrich-Schiller-Universität in
Jena, Rechtswissenschaftliche Fakultät

4 / 1996 Erfolgreicher Abschluss des Grundstudiums in Jura,
speziell Staats- und Verfassungsrecht, Beginn des Jura-
Hauptstudiums

10 / 1997 Grundstudium in Biologie und Psychologie

10 / 1998 Erfolgreicher Abschluss des Grundstudiums der Biologie
(Bacchalar), Beginn des Biologie-Hauptstudiums

7 / 1999 Erfolgreicher Abschluss des Psychologie
Grundstudiums, Beginn des Psychologie-Hauptstudiums

1999 – 2001 Studentische Mitarbeiterin am Institut für Spezielle
Botanik, FSU Jena, am Lehrstuhl von H. Doz.. Dr. Helga
Dietrich

2 / 2001 – 3 / 2001 Botanische Expedition auf Kuba unter Leitung von
Professor Dr. Frank Hellwig, Institut für Spezielle
Botanik, FSU Jena

12 / 2001 Erfolgreicher Abschluss des Hauptstudiums in Biologie,
Rechtswissenschaft sowie Psychologie

Akademischer Grad: **Magistra Scientiarum M.Sc.**

Thema der Magisterarbeit:

„Die Ontogenese der Narbe und des Griffels bei verschiedenen Vertretern
Der Gattung Cyclamen und deren Konsequenz für die Optimierung
der Vermehrung unter Zuchtbedingungen.“

3/2002

Feierliche Exmatrikulation von der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Promotion und beruflicher Werdegang:

4/2002

Annahme als Doktorandin an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, am Institut für Spezielle Botanik

Thema der Arbeit: „Vergleichende morphologisch- anatomische und physiologische Untersuchungen zur Samenanlagenqualität von *Cyclamen persicum* L.- unter besonderer Berücksichtigung der Saatgutqualität.“

3/2002 – 31.März 2004
sowie 7/2004 –
31.Dezember 2004

Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibnitz Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. in Erfurt/Kühnhausen

1/2005 – 3/2005

Fertigstellung der Dissertationsschrift mit einem Promotionsabschlusstipendium des Thüringer Graduiertenförderungsprogramms

6/2005

Eröffnung des Promotionsverfahrens an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

6.Juli 2005

Doktorprüfung im Fach Botanik

08/2004 – 5/2005

Nebenberufliche Tätigkeit als Dozentin

5/2005 – 11/2005

Freiberufliche Tätigkeit als Biologin und Dozentin

seit 12/2005

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibnitz Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren / Erfurt e.V. in Erfurt/Kühnhausen

Erfurt, 12. Mai 2005

Sandra Reinhardt

Veröffentlichungen

Reinhardt, S., 2005. The microscope: a historic research instrument in new packaging, throughout the ages and development of scientific questions. Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren und Erfurt: Research Report 2003 / 2004, 8-12.

Ewald, A.; **Reinhardt, S.**; Ajunintia, A.; Hohe, A., 2004. Seed quality analysis in *Cyclamen persicum* MILL. with regard to seed position in the capsule. 9. International Symposium on Plant Seeds: Seeds in the –omics Era. Meisdorf/Gatersleben, Deutschland. Programm, Abstracts and List of Participants, 118.

Reinhardt S., Ewald A., 2003, Untersuchungen zur Prädetermination der Saatgutqualität bei *Cyclamen persicum* cv., Abstract, 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften e.V. 25.-27.9.2003, Gießen

Ewald A., Orlicz-Luthardt A., **Reinhardt S.**, Zerche S., 2003, Anwendungsorientierte Grundlagenforschung zur Saatgutqualität von Zierpflanzen am Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. , Abstract, 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften e.V. 25.-27.9.2003, Gießen

Reinhardt S., Hellwig F., Ewald A., 2002, Blütenbiologische Untersuchungen an *Cyclamen persicum* Mill. mittels Rasterelektronenmikroskopie, Vorträge für Pflanzenzüchtung 54, 365-367

Poster

Ewald, A.; **Reinhardt, S.**; Ajunintia, A.; Hohe, A., 2004. Seed quality analysis in *Cyclamen persicum* MILL. with regard to seed position in the capsule. 9. International Symposium on Plant Seeds: Seeds in the –omics Era. Meisdorf/Gatersleben, Deutschland. Programm, Abstracts and List of Participants, 118.

Reinhardt S., Ewald A., 2003, Untersuchungen zur Prädetermination der Saatgutqualität bei *Cyclamen persicum* cv., Poster, 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften e.V. 25.-27.9.2003, Gießen

Ewald A., Orlicz-Luthardt A., **Reinhardt S.**, Zerche S., 2003, Anwendungsorientierte Grundlagenforschung zur Saatgutqualität von Zierpflanzen am Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. , Poster, 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften e.V. 25.-27.9.2003, Gießen

Reinhardt S., Hellwig F., Ewald A., 2002, Blütenbiologische Untersuchungen an *Cyclamen persicum* Mill. mittels Rasterelektronenmikroskopie, Poster, 6.Tagung der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung e.V., Stuttgart-Hohenheim

Vorträge

Reinhardt S., (Ewald A., Hellwig F.) November 2004, Samenentwicklung und Saatgutqualität bei *Cyclamen persicum* in Abhängigkeit von der Position der Samen in der Kapsel, Vortrag, Tag der Doktoranden, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Erfurt

Reinhardt S., (Ewald A., Hellwig F.) November 2003, Vergleichende anatomisch-morphologische und physiologische Untersuchungen zur Samenanlagenqualität von *Cyclamen persicum* Mill.- unter besonderer Berücksichtigung der Saatgutqualität, Seminar Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Spezielle Botanik

Reinhardt S., (Ewald A., Hellwig F.) August 2003, Vergleichende anatomisch-morphologische und physiologische Untersuchungen zur Samenanlagenqualität von *Cyclamen persicum* Mill.- unter besonderer Berücksichtigung der Saatgutqualität, Vortrag, Seminar an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Quedlinburg

Reinhardt S., (Ewald A., Hellwig F.) April 2003, Vergleichende anatomisch-morphologische und physiologische Untersuchungen zur Samenanlagenqualität von *Cyclamen persicum* Mill.- unter besonderer Berücksichtigung der Saatgutqualität, Vortrag, Tag der Doktoranden, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Großbeeren